

Université de Montréal

**Caractérisation de DKK1 comme antigène tumoral et
manipulation des lymphocytes T CD8 : utilisation de la
voie de Wnt en immunothérapie du cancer**

par

Marie-Andrée Forget

Programme de Sciences Biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Sciences Biomédicales

Mai 2011

© Marie-Andrée Forget, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Caractérisation de DKK1 comme antigène tumoral et manipulation des lymphocytes T
CD8 : utilisation de la voie de Wnt en immunothérapie du cancer

Présentée par :
Marie-Andrée Forget

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Martin Guimond, président-rapporteur
Dr. Réjean Lapointe, directeur de recherche
Dr. John Stagg, membre du jury
Dr. Jonathan Bramson, examinateur externe
Dr. Jean-François Gauchat, représentant du doyen

Résumé

L'immunothérapie tumorale à médiation cellulaire est un traitement qui utilise le système immunitaire des patients afin d'induire une réponse des lymphocytes T CD8⁺ (T CD8⁺) contre la tumeur. Cette réponse est produite suite à la reconnaissance des antigènes par les T CD8⁺. Ces cibles sont appelées antigènes tumoraux (TAA) et définies comme des protéines exprimées par les cellules cancéreuses mais absentes des tissus normaux. Par une approche bio-informatique, notre laboratoire a identifié Dickkopf-1 (DKK1), une protéine inhibitrice de la voie de Wnt, comme un TAA potentiel. Une immunothérapie à médiation cellulaire efficace requiert l'identification de TAA candidats pertinents. Le traitement de patients par immunothérapie pourrait également être améliorées par l'augmentation de la puissance d'action anti-tumorale ainsi que la persistance des T CD8⁺ spécifiques aux TAA.

Ce projet de doctorat se divise en deux parties : 1- La caractérisation de l'expression de DKK1 dans les cancers communs et la détermination de son immunogénicité afin de valider sa candidature comme TAA. 2- La reprogrammation des T CD8⁺, de patients atteints d'un cancer commun, vers un phénotype moins différencié afin d'augmenter leur potentiel anti-tumoral et leur persistance.

Dans le premier objectif, nous avons caractérisé l'expression de DKK1 dans le cancer du sein et dans d'autres cancers communs. Le profil d'expression de DKK1 a été étudié par RT-PCR et par ELISA dans plusieurs lignées cellulaires de cancer et dans les tissus normaux. L'expression de DKK1 a aussi été étudiée dans des échantillons cliniques provenant de cancers du sein, du poumon et du rein. Trente pourcents (30%) des tumeurs provenant d'un cancer du sein exprimaient DKK1. La moitié des tumeurs DKK1(+) était triple négative, donc pas de récepteurs d'œstrogène et de progestérone et était Her-2/*neu*(-) (ces patientes ont des possibilités de traitements très restreintes). De plus, 50% des

échantillons cliniques de tumeurs du poumon et 30% des tumeurs de rein exprimaient DKK1. Les observations effectuées dans le cancer du poumon ont été, par la suite, corroborées par d'autres groupes qui ont montré une corrélation entre l'expression de DKK1 et un mauvais pronostic.

Après avoir confirmée l'expression de DKK1 dans les cancers communs, justifiant ainsi sa candidature comme TAA, nous avons évalué l'immunogénicité de DKK1. Pour ce faire, nous avons effectué des stimulations *in vitro* de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patient(e)s atteint(e)s d'un cancer du sein ou du poumon avec des peptides dérivés de DKK1 pouvant être présentés par les complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) HLA-A*0201. Des clones de T CD8⁺ reconnaissant un peptide de DKK1 ont été identifiés et isolés. Par essai multiplex et cytométrie de flux intracellulaire, la polyfonctionnalité d'un ces clones T CD8⁺ spécifiques à DKK1 a été étudiée et a révélée un profil effecteur, renforçant ainsi la candidature de DKK1 comme TAA. Dans l'ensemble, les résultats obtenus dans cette première partie de thèse suggèrent une possible utilisation de DKK1 en immunothérapie contre les cancers communs, attribuable à son expression dans ces cancers et la possibilité de faire proliférer des T CD8⁺ effecteurs spécifiques à DKK1 à partir de sang de patients.

Dans la seconde partie de cette thèse, je décrirai la manipulation *in vitro* des T CD8⁺ de patients atteints d'un cancer commun, afin d'augmenter la force et la durée de leurs fonctions anti-tumorales. Il a été démontré que des lymphocytes moins différenciés sont capables d'une réponse immunologique plus efficace et durable. Nous avons basé ce projet sur l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la GSK-3 β , pour activer de la voie de Wnt chez les T CD8⁺ et ainsi leur conférer un phénotype moins différencié, partageant des caractéristiques de la cellule naïve et de la cellule mémoire. Des cultures de T CD8⁺, spécifiques à des antigènes viraux, en présence de l'inhibiteur ont permis d'augmenter la sécrétion d'interféron (IFN)- γ et leur activité cytotoxique. Ces résultats indiquent un effet de l'activation de la voie de Wnt sur la fonction des T CD8⁺. Ces observations sont rapportées pour la première fois chez les T CD8⁺ humains et suggèrent une nouvelle

stratégie, applicables à l'immunothérapie du cancer, afin de prolonger la persistance des cellules ainsi que leur activité anti-tumorale.

En conclusion, ces travaux de recherche ont mené à la réalisation d'une étape très importante dans la validation de la candidature de DKK1 comme TAA pour les cancers communs, soit la démonstration de son expression dans ces cancers et son absence dans les tissus normaux dérivés d'organes importants. Ces travaux ont également mené à la démonstration de l'immunogénicité de DKK1, par l'identification d'un peptide de DKK1 reconnu par les T CD8⁺. De plus, l'étude de la polyfonctionnalité des T CD8⁺ spécifiques à DKK1 a révélée un profil effecteur favorable pour l'obtention d'une réponse anti-tumorale efficace. Ces découvertes pourraient servir à l'élaboration d'une stratégie d'immunothérapie à médiation cellulaire pour les cancers communs. Pour sa part, l'étude phénotypique et fonctionnelle de la modulation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺ a donné lieu à l'observation d'un phénotype encore jamais rapporté chez l'humain, conférant aux T CD8⁺ un aspect moins différencié avec des caractéristiques propre à un phénotype mémoire. Ces résultats sont pertinents dans l'amélioration de l'immunothérapie du cancer, passant par l'augmentation de la persistance des lymphocytes. En résumé, les résultats présentés dans cette thèse de doctorat fournissent des évidences indéniables quant à la validation de DKK1 comme TAA pour une immunothérapie à médiation cellulaire des cancers communs. Ces résultats fournissent également des preuves quant à la pertinence de la reprogrammation des T CD8⁺ par l'activation de la voie de la voie de Wnt, afin de générer des lymphocytes médiateurs plus efficaces pour ce type de thérapie.

Mots-clés

Dickkopf-1

Lymphocytes T CD8⁺

Immunothérapie du cancer

Antigène tumoral

Humain

Cancer du sein

Cancer du poumon

Voie de Wnt

Abstract

Cell-mediated cancer immunotherapy is based on the priming of the patient's CD8⁺ T lymphocytes (CD8⁺ T cells) to mediate an immune response directed against the tumour. This anti-tumour response is antigen-specific and directed against tumour associated antigens (TAA), which are defined as proteins expressed principally by cancer cells and absent from non-malignant tissues. By utilizing a bio-informatic approach, we identified the gene DKK1, a Wnt pathway inhibitor, as a potential TAA. This was an important novel finding as the identification of a new TAA is one of the key elements to enhance cell-mediated cancer immunotherapy. Furthermore, patient treatment options may also be improved through the amplification of the force and duration of the anti-tumour immune response mediated by TAA specific T cells.

This thesis is divided in two parts: 1- The characterization of DKK1 expression and immunogenicity in common cancers as validation of TAA candidate. 2- The reprogramming of CD8⁺ T cells from patient with common cancers to restore a less-differentiated phenotype in an attempt to improve their anti-tumour response.

We first characterized DKK1 expression in breast cancer and other common cancers. In order to prove its specificity to malignant tissues, the DKK1 expression profile was initially established by RT-PCR and ELISA assay using cancer cell lines and in RNA panels from normal tissues. DKK1 expression was also described using clinical samples from breast, lung and kidney cancers. We found that 30% of breast cancer clinical samples were positive for DKK1 expression. Interestingly, half of the triple negative breast cancer tumours (negative for the expression of progesterone and estrogen receptors and Her-2/*neu*) were DKK1 (+). Moreover, 50% of the lung cancer and 30% of the kidney cancer clinical samples were also DKK1 (+). These results have been corroborated by other groups who

recently reported similar observations in lung cancer with a correlation with poor prognosis.

After confirming that the DKK1 gene expression profile in common cancer qualifies DKK1 as a relevant TAA, we then explored its immunogenicity. To do so, we performed *in vitro* stimulations of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from lung and breast cancer patients with DKK1-derived synthetic peptides, which were selected for their capacity to be presented by the major histocompatibility complex (MHC) HLA-A*0201. With this method, we identified and isolated CD8⁺ T cell clones with a specificity unique for one DKK1 peptide. Cytokine secretion profile of anti-DKK1 T cells was established by cytokine multiplex assay and flow cytometry. This study revealed that DKK1-specific CD8⁺ T cells had an effector profile with polyfunctionality properties, thereby reinforcing DKK1 as a TAA candidate. Altogether, the results obtained in this first part of this thesis suggest the possible use of DKK1 in common cancer immunotherapy as it is principally expressed by malignant tissues and can generate the activation of effector CD8⁺ T cells.

In the second part of this thesis, I will describe *in vitro* manipulations of patients' CD8⁺ T cells in the goal of augmenting their longevity and the strength of the anti-tumour response. Previous research revealed that a less-differentiated phenotype correlated with an augmented capacity of persistence and the intensity of the T cell response. For this project, we generated less-differentiated CD8⁺ T cells by activating the Wnt pathway with a pharmacological inhibitor of GSK-3 β . These less-differentiated T cells shared a phenotype of both naive and memory T cells. As for their immune functions, viral antigen specific CD8⁺ T cells cultured with the inhibitor showed an elevation in interferon (IFN)- γ production and cytotoxic activity. This represents the first report of such observations in humans CD8⁺ T cells and suggests a new strategy to prolong the persistence of T cells in a cancer immunotherapy setting.

In conclusion, this work has strongly contributed to the validation of DKK1 as a TAA for common cancers, as it is expressed in malignant tissues and relatively absent in

form normal tissues. It demonstrated the immunogenicity of DKK1 with the identification of a DKK1 peptide recognized by CD8⁺ T cells. Moreover, these DKK1-specific CD8⁺ T cells appear to be polyfunctional with an effector profile, which is favorable to mount a potent anti-tumour response. These findings could serve in novel strategies to be exploited in cell-mediated immunotherapy against common cancers. Furthermore, the phenotypic and functional study of the Wnt pathway activation resulting in a less-differentiated CD8⁺ T cells, generated observations that had never been reported in humans. These findings are relevant for cancer immunotherapy because they could help generate less-differentiated cells with augmented persistence and anti-tumoral capacities. Altogether, the results presented in this doctoral thesis provide significant evidence that DKK1 may serve as a TAA in cell-mediated immunotherapy for patients affected by common cancers and that reprogramming of CD8⁺ T cells through activation of the Wnt pathway could generate more effective mediator for this type of treatment.

Keywords

Dickkopf-1

CD8⁺ T lymphocytes

Cancer Immunotherapy

Tumour associated antigens

Human

Breast cancer

Lung cancer

Wnt pathway

Table des matières

Pages liminaire

Résumé.....	i
Mots-clés.....	iv
Abstract	v
Keywords	viii
Table des matières.....	ix
Liste des tableaux.....	xiii
Liste des figures	xiv
Liste des abréviations.....	xvii
 SECTION 1. INTRODUCTION.....	 1
<i>Objectif général et structure de la thèse</i>	<i>1</i>
 1.1 Le cancer	 1
1.1.1 Épidémiologie et description sommaire.....	1
1.1.2 Occurrences du cancer	8
 1.2 Le système immunitaire et le cancer	 12
1.2.1 L'immunosurveillance	12
1.2.2 L'immunoédition	13
1.2.2.1 L'élimination.....	15
1.2.2.2 L'équilibre.....	22
1.2.2.3 L'évasion.....	23
 1.3 Les antigènes tumoraux.....	 29
1.3.1 Définition	29

1.3.2	Classification des antigènes tumoraux	32
1.4	L'immunothérapie des cancers non-hématologiques	36
1.4.1	L'immunothérapie par les cytokines	37
1.4.2	L'immunothérapie par les anticorps bloquants	40
1.4.3	Immunothérapie à médiation cellulaire	43
1.4.3.1	Les Vaccins	43
1.4.3.1.1	Vaccins à base de peptides	44
1.4.3.1.2	Vaccins à base de cellules tumorales	47
1.4.3.1.3	Vaccins à base de cellules dendritiques (DC)	51
1.4.3.1.4	Vaccination par transfert de gènes	53
1.4.3.2	Transfert adoptif de lymphocytes	58
1.4.3.2.1	Transfert adoptif de lymphocytes T, cultivés in vitro, spécifiques à des antigènes viraux ou tumoraux	60
1.4.3.2.2	Transfert adoptif de lymphocytes T ayant infiltrés les tumeurs (TIL)	61
1.4.3.2.3	Transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés	68
1.4.4	Les défis de l'immunothérapie du cancer	74
1.5	Identification de nouveaux antigènes tumoraux dans les cancers communs	76
1.5.1	Stratégie employée pour l'identification de nouveaux antigènes tumoraux	76
1.5.2	Dickkopf-1 comme antigène tumoral candidat	79
1.6	Effets phénotypiques et fonctionnels de la modulation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T CD8⁺	85
1.6.1	Stratégie employée dans la manipulation des lymphocytes T CD8 ⁺	89
1.6.2	La voie de Wnt dans les lymphocytes T	90
1.7	Objectifs du projet de doctorat	94

SECTION 2. MANUSCRIT 1	96
The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types	96
Abstract	97
Introduction	99
Materials and Methods	101
Results	106
Discussion	111
Figures and Table	116
SECTION 3. MANUSCRIT 2	130
Polyfunctionality of a DKK1 self-antigen-specific CD8 T lymphocyte clone in lung cancer	130
Abstract	131
Introduction	133
Materials and Methods	135
Results	138
Discussion	140
Figures and Table	143
SECTION 4. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	151
4.1 Justification	152
4.2 Matériels et Méthodes	154
4.3 Résultats et Conclusions	159
Figures	167
SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS	178
5.1 Expression de DKK1 dans les cancers du sein hormono-indépendants, et autres cancers communs	181

5.1.1	Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats	181
5.1.2	Perspectives et conclusions	193
5.2	Étude de la polyfonctionnalité d'un clone de lymphocyte T CD8⁺, spécifique à DKK1, isolé d'un patient atteint d'un cancer du poumon	197
5.2.1	Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats	197
5.2.2	Perspectives et conclusions	209
5.3	Étude des effets phénotypiques et fonctionnels de la modulation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T CD8⁺	212
5.3.1	Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats	212
5.3.2	Perspectives et conclusions	215
5.4	Conclusions générales	221
	Bibliographie.....	222
	ANNEXE I. Manuscrit.....	xx
	ANNEXE II. Manuscrit	xxi

Liste des tableaux

SECTION 1. INTRODUCTION

Tableau I.	Critères d'inclusion pour valider l'inscription d'un antigène dans la base de données d'antigènes tumoraux définis pour les lymphocytes T.....	31
Tableau II.	Stratégies de transfert adoptif et leurs défis	59

SECTION 2. MANUSCRIT 1

Supplementary data Table I ^{m1}	124
------------------------------------------------	-----

SECTION 3. MANUSCRIT 2

Table I ^{m2}	145
-----------------------------	-----

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Tableau III.	Liste des patient(e)s de cancer commun dont les PBMC ont été stimulés in vitro avec les peptides synthétiques de DKK1 et sommaire des résultats..	199
--------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des figures

SECTION 1. INTRODUCTION

Figure 1.	Répartition en pourcentage du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez les femmes, au Canada en 2010	6
Figure 2.	Répartition en pourcentage du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez les hommes, au Canada en 2010	7
Figure 3.	Les 7 événements caractéristiques au cancer selon Hanahan, Weinberg et Mantovani.....	11
Figure 4.	Les 3 phases constituant l'immunoédition dans le cancer	14
Figure 5.	Classification des cellules du système immunitaire selon leur appartenance à l'immunité innée ou adaptative.	16
Figure 6.	Présentation antigénique classique par CMH de classe I et classe II	19
Figure 7.	Présentation croisée d'une protéine exogène par CMH de classe I.....	21
Figure 8.	Cultures de lymphocytes ayant infiltrés des tumeurs pour un transfert adoptif	64
Figure 9.	Représentation schématique de la structure d'un TCR $\alpha\beta$ et du complexe CD3 de lymphocyte T	69
Figure 10.	Molécules participant à l'activation d'un lymphocyte T CD8 ⁺	73
Figure 11.	Inhibition (par DKK1 à gauche) et activation (droite) de la voie de Wnt/Frizzled	81
Figure 12.	Possibilité de modèle pour la différenciation des lymphocytes T mémoires	87

SECTION 2. MANUSCRIT 1

Figure 1 ^{m1} .	Expression profile of genes selected by the bio-informatic approach in tumour cell lines and PBMC	116
Figure 2 ^{m1} .	Expression profile of DKK1 in normal tissues.....	118
Figure 3 ^{m1} .	DKK1 expression from breast cancer clinical samples	120

Figure 4 ^{m1} . DKK1 expression in tumours derived from multiple sites.....	122
Supplementary data Figure 1 ^{m1}	126
Supplementary data Figure 2 ^{m1}	126

SECTION 3. MANUSCRIT 2

Figure 1 ^{m2} . Cytokine secretion profile of a CD8 ⁺ T lymphocyte clone specific for DKK1 20-29, expanded from a lung cancer patient's PBMC	143
Online resource 1 ^{m2} . DKK1 peptides' binding capacity to HLA-A*0201 molecule.....	146
Online resource 2 ^{m2} . Expansion of T lymphocytes specific for DKK peptide 20-29.....	147

SECTION 4. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Figure 13. Protocole général d'activation et de culture des lymphocytes T CD8 ⁺ stimulés par le CD3 en présence d'IL-2, avec ou sans l'activateur de la voie de Wnt (TWS119)	167
Figure 14. Caractérisation de marqueurs de différenciation sur les lymphocytes T CD8 ⁺ de donneurs normaux cultivés avec le TWS119	168
Figure 15. Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8 ⁺ définies par l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L, chez les donneurs normaux après culture avec le TWS119.....	170
Figure 16. Caractérisation de marqueurs de différenciation sur les lymphocytes T CD8 ⁺ des cellules immunitaires ayant infiltrées des tumeurs de cancer du poumon et du sein, cultivés avec le TWS119.....	172
Figure 17. Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8 ⁺ , isolés des cellules immunitaires ayant infiltrées des tumeurs du poumon, définie par l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L, après culture avec le TWS119.....	174
Figure 18. Évaluation fonctionnelle des lymphocytes T CD8 ⁺ suivant un traitement au TWS119.....	176

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Figure 19.	Expression de DKK1 dans les échantillons cliniques de tumeurs de cancer du poumon.	189
Figure 20.	Méthodologie des stimulations de PBMC de patients avec les peptides synthétiques de DKK1	200
Figure 21.	Sécrétion d'IFN- γ d'un clone de T CD8 ⁺ isolé d'une patiente atteinte d'un cancer du sein, suite à la reconnaissance du peptide 20 de DKK1 à des concentrations décroissantes	203
Figure 22.	Modèle de compétition entre DKK1 et le TWS119	219

Liste des abréviations

a.a., acides aminés

ADNc, acides désoxyribonucléiques complémentaires

ARNm, acides ribonucléiques messagers

APC, cellule présentatrice d'antigène

CAR, récepteurs chimériques d'antigènes

CD40-B, lymphocytes B stimulés au CD40-ligand

CMH, complexe majeur d'histocompatibilité

CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4

DKK1, Dickkopf-1

EBV-B, lymphocytes B immortalisés avec le virus d'Epstein-Barr

EGF, facteur de croissance épidermique

ELISA, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ELISPOT, Enzyme-Linked Immunospot Assay

ER, récepteur de l'œstrogène

Foxp3, forkhead box P3

GSK-3 β , glycogen synthetase kinase 3 β

HSP, protéine de choc thermique

Her-2/*neu*, récepteur de croissance épidermique 2

HLA, human leukocyte antigen

IL, interleukine

INF, interféron

IP-10, protéine-10 induite par l'interféron- γ

ICS, cytométrie en flux intracellulaire

LEF, lymphoid enhancer-binding factor

LRP 5/6, low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6

LPS, lipopolysaccharides

MAGE-1, melanoma-associated gene-1
MDSC, cellule inhibitrice dérivée de précurseurs myéloïdes
MIP-1, protéine inflammatoire du macrophage 1
MLR, réaction leucocytaire mixte
PBMC, cellules mononucléées du sang périphérique
PCR, réaction en chaîne par polymérase
PDEF, Prostate-derived Ets transcription factor
PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase
PCK, phospholipase C
PR, récepteur de la progestérone
REP, protocole d'expansion rapide de lymphocytes T
RECIST, Response Evaluation Criteria in Solid Tumors
TAA, antigène associé aux cellules tumorales/antigène tumoral
TAM, macrophage infiltrant les tumeurs
TAP, transporteur associé à la présentation antigénique
TBI, irradiation complète du corps par radiothérapie
T CD8⁺, lymphocytes T CD8⁺
T CD4⁺, lymphocytes T CD4⁺
TCF, T cell factor
T_{CM}, lymphocytes T mémoires central
TCR, récepteur des cellules T
TGF-β, facteur de croissance transformant-β
Th, lymphocyte T CD4⁺ auxiliaire
THC, cellules immunitaires ayant infiltrées les tumeurs
TIL, lymphocytes T ayant infiltrés les tumeurs
TNF-α, facteur de nécrose tumorale-α
T_N, lymphocytes T naïfs
Treg, lymphocytes T régulateurs
T_{SCM}, lymphocytes T à caractère partagé de cellules souches et mémoires

VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire

Wnt, Wingless (protéine et la voie de signalisation)

À mes parents et ma filleule Julianne

Remerciements

Cette thèse de doctorat représente pour moi une étape importante de ma vie, autant sur le plan professionnel, que sur le plan personnel. Ainsi, je veux profiter de l'opportunité qui m'est donnée pour remercier tous ceux et celles qui m'ont permis de réaliser ce qui est pour moi un accomplissement majeur et qui a fait de moi la personne qui, aujourd'hui, écrit ces lignes.

La première personne devant recevoir mes remerciements est mon directeur de recherche, Réjean Lapointe. Réjean, tu as été mon mentor, mon patron et qui plus est, un ami. Merci d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir accordé ta confiance. Ta tolérance, ton dynamisme, ta passion et ton ouverture d'esprit sont des qualités qui t'honorent et dont j'espère avoir tiré quelques leçons.

Je désire maintenant remercier les membres de mon laboratoire, ma deuxième famille. Tout d'abord, celle avec qui tout a commencé et avec qui ça se termine, Jessica. Jess, je suis contente d'avoir eu la chance de partager toutes ces années en ta compagnie. Quelqu'un de si différent de moi, mais qui m'apportait, je le réalise maintenant que tu es partie, un complément important. Viens ensuite ma française préférée, ma Cécile. Merci de ta générosité sans borne, ta spontanéité et ta douce folie. Ne laisse jamais personne (y compris toi) te faire croire que tu n'as pas les capacités de faire tout ce que tu désires dans la vie. Passons maintenant au grand mec avec un tout aussi grand cœur, Alexandre. Ta présence dans les moments de tempête, je ne l'oublierai jamais. Ma seule crainte est de ne pas avoir pu te rendre la moitié de ce que tu m'as donnée. C'est maintenant le tour de Jean-Daniel, J-D. Merci de m'avoir fait confiance pour t'accompagner dans un moment aussi important de ta vie. Je suis fier de ce que tu es devenu et j'anticipe déjà, ce que tu deviendras. Passons à celle qui m'aura enseigné quelques petites leçons de vie, Laïla. Merci d'avoir été là, même quand je ne le voyais pas. Merci pour toutes ces sorties partagées avec plaisir et qui étaient si essentielles à ma survie durant ce doctorat. Maintenant, celui qui m'a partiellement guéri de mon complexe de l'imposteur, Philippe. Merci de ces moments

passés à discuter autour d'une bière, à me pousser à voir plus loin que mes propres limites. Merci aussi à Dominique qui, à son arrivée, m'a soulagée de quelques responsabilités dans le labo, tout en respectant ma place. Je tiens à remercier également Urszula pour son travail et sa banque de tissus sans laquelle j'aurais eu beaucoup de difficulté à mener à bien ce projet. Finalement, merci à mes collègues du 4^e étage, Jean-François, Stéphanie et Marie-Joëlle ; labo Cailhier, vous faites partie de ma famille.

Merci aux anciens membres du laboratoire, surtout Diane qui m'a si bien accueillie à mon arrivée. Je veux également remercier mon petit chirurgien, Simon, pour qui j'ai beaucoup d'admiration et dont je garde un très bon souvenir de son année passée avec nous.

Elle entre dans plusieurs catégories, alors je m'adresserai à elle ainsi : Sandy, mon ancienne collègue, ma coloc, mon amie. Merci d'avoir été présente tout au long de cette aventure. Tu m'as donné joie, soutien et réconfort quand j'en ai eu besoin. Je suis contente que tu aies un jour accepté de venir faire un stage avec nous, sans quoi je n'aurais pas connu cette super collègue de travail, cette merveilleuse coloc et cette bonne amie.

À mes deux hommes, Yannick et Julien. Merci de m'avoir accueillie et si bien intégrée dans votre quotidien. Vous êtes très vite devenus très importants pour moi. Sachez que votre amitié m'est très précieuse.

Tout au long de mon doctorat, j'ai eu besoin d'une base solide, de racines; merci à ma chère amie Sonia de m'avoir donné cette stabilité. Merci également à ma chère amie Karine, qui comme moi, a vécu l'aventure d'un doctorat et avec qui j'ai partagé mes angoisses, comme mes moments de bonheur. Les filles, c'est un honneur de vous connaître.

Je tiens à remercier les membres de ma grande famille pour le soutien qu'ils m'ont apporté, de près ou de loin. Je les remercie de s'être réjoui avec moi dans les bons moments (même s'ils ne comprenaient pas toujours pourquoi ils devaient se réjouir) et d'avoir également partagé mes peines. Un merci tout spécial à Audrey, ma chère cousine, qui m'a accompagnée tout au long de ce doctorat et qui m'a poussée à aller toujours plus

loin. Merci à Luce pour son écoute et à Marie-Christine et Sébastien pour avoir mis dans ma vie deux petites filles que j'adore, dont l'une est d'ailleurs ma belle filleule... bisous Julianne. Les Rivest... je vous aime.

Finalement, rien de tout cela n'aurait été possible sans la présence et le soutien indéfectible de mes parents, les deux personnes les plus extraordinaires qu'il m'a été donné de connaître. Mes parents m'ont sans cesse appuyée dans tout ce que j'ai entrepris et m'ont toujours témoigné leur fierté. Aujourd'hui, j'aimerais leur rendre la pareille et leur dire que je suis fière de ce qu'ils ont été, de ce qu'ils sont devenus et ce vers quoi ils évoluent. Je suis également fière des valeurs qu'ils m'ont transmises et de l'impact qu'ils ont dans la vie des gens qui les côtoient. Leur générosité, leur disponibilité et leur amour se doivent d'être soulignés. Je vous aime et vous remercie pour tout ce que vous m'avez donné dans la vie.

SECTION 1. INTRODUCTION

Objectif général et structure de la thèse

L'objectif premier de ce projet de doctorat était d'identifier et de caractériser de nouveaux antigènes tumoraux pouvant être utilisés dans un traitement par immunothérapie, dans le contexte des cancers communs comme ceux du sein et du poumon. Le champ d'étude a, par la suite, été élargi à l'amélioration de l'immunothérapie à médiation cellulaire, toujours dans le contexte des cancers communs. Cet élargissement du projet a résulté en l'ajout d'une partie additionnelle à la thèse visant la manipulation des lymphocytes T CD8⁺, afin d'augmenter leur capacité d'action dans l'immunothérapie anti-tumorale. La SECTION 1 est une mise en contexte ainsi qu'une recension de la littérature en lien avec ces travaux. Les SECTIONS 2 et 3 concernent la protéine DKK1 comme antigène tumoral potentiel. La SECTION 2 est la présentation, sous forme d'article, du profil d'expression de DKK1 dans les cancers communs. La SECTION 3, présentée sous forme de manuscrit, dépeint le portrait de la polyfonctionnalité d'un clone de lymphocyte T CD8⁺ spécifiquement dirigé contre un peptide de DKK1. La SECTION 4 concerne la deuxième partie de ce projet de doctorat. Elle comporte des résultats supplémentaires montrant différentes analyses du phénotype de lymphocytes T CD8⁺ cultivés en présence d'un activateur pharmacologique de la voie de Wnt.

1.1 Le cancer

1.1.1 Épidémiologie et description sommaire

Selon le *Comité directeur de la Société canadienne du cancer*, à chaque heure écoulée au Canada, 20 personnes reçoivent un diagnostic de cancer et 8 individus en décèdent. On estime à 173 800 le nombre de nouveaux cas de cancer qui auront été diagnostiqués au Canada en 2010, soit 2800 cas de plus qu'en 2009. Les chiffres

augmentent également lorsqu'il est question de la mortalité : 76 200 décès reliés au cancer sont prévus pour l'année 2010, comparativement à 75 300 pour 2009 (1). Les cancers du sein, des poumons, du colon/rectum et de la prostate sont les quatre cancers se partageant plus de la moitié des nouveaux cas diagnostiqués au Canada. Ces cancers font partie des cancers dits "communs". Cette appellation leur a été conférée par le *National Cancer Institute* (NCI), car ce sont également les cancers les plus fréquemment diagnostiqués aux États-Unis (2). La liste des cancers communs émise par le NCI est plutôt exhaustive; elle comprend également les cancers du rein, de la vessie, de la thyroïde et du pancréas. On y retrouve aussi le mélanome, la leucémie, le lymphome Non-Hodgkinien ainsi que les cancers endométriaux. Pour les besoins de cette étude, une attention particulière sera accordée aux cancers du poumon et du sein. Ces cancers seront les principaux visés par l'appellation "cancers communs".

Le cancer du poumon

Les statistiques se rattachant au cancer du poumon, bien que globalement connues du grand public, demeurent troublantes. Le cancer du poumon est le deuxième cancer le plus diagnostiqué au Canada en 2010, chez la femme comme chez l'homme, comme le montre les Figures 1A et 2A. Il s'agit également du cancer le plus meurtrier, encore une fois pour les 2 sexes confondus (Figures 1B et 2B). Lorsque l'on compare les pourcentages de mortalité attribuables aux autres cancers touchant les hommes, la somme obtenue pour les 3 cancers les plus meurtriers, soit les cancers du colon, de la prostate et du pancréas, n'équivaut pas encore au pourcentage de décès obtenu pour le cancer du poumon.

Les traitements traditionnellement utilisés contre le cancer du poumon demeurent la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements sont utilisés soit seul ou en combinaison. La chirurgie est privilégiée pour les cancers du poumon de type histologique dit "non à petites cellules" (NSCLC). Les cancers de type NSCLC se divisent en 3 catégories : les adénocarcinomes qui sont le plus fréquemment diagnostiqués, les

épidermoïdes et les cancers à grande cellules. Les NSCLC sont les cancers du poumon présentant le pronostic le plus sombre. Le deuxième type de cancer du poumon, soit les cancers "à petites cellules" (SCLC) sont plus rarement observés. La chimiothérapie est préconisée pour ce type de cancer, mais la radiothérapie peut également être utilisée comme traitement de second ordre (3, 4). Le type histologique est un bon indicateur pronostique en soi, mais comme la majorité des cancers du poumon sont de type NSCLC, une classification supplémentaire peut aider à raffiner le diagnostic. Cette classification est nommée TNM et est établie par l'*American Joint Commission on Cancer*. La classification TNM est reconnue mondialement et est utilisée dans la classification par stade de plusieurs cancers. Dans le cadre du cancer du poumon, elle est basée sur la taille (T) de la tumeur, mais inclus également l'invasion ou la localisation. La composante "N" rend compte de l'atteinte ganglionnaire selon la présence de métastases ganglionnaires et la localisation des ganglions atteints. La dernière variable (M) prend en considération la présence de métastases locales ou distales (5). Cette stadification représente un ensemble de données considérables ayant une grande importance lors de la prise de décision face aux traitements à adopter.

Le cancer du poumon a récemment célébré le triste anniversaire de ses 100 ans. Il semblerait que ce cancer doit, en grande partie, son apparition à la consommation de tabac. Ceci expliquerait son absence presque totale avant le 20^e siècle. Malgré les nombreux efforts apportés dans l'amélioration des traitements, le taux de survie en 5 ans demeure autour de 16% (3, 4).

Le cancer du sein

Comme il a été mentionné précédemment, le deuxième cancer d'intérêt pour cette étude est le cancer du sein. Tel que présenté à la Figure 1, ce cancer a un grand impact chez les femmes; il s'agit du cancer le plus diagnostiqué, devant le cancer du poumon et celui du colon. Il est également pertinent d'ajouter que le cancer du sein occupe le deuxième rang, derrière le cancer du poumon, en ce qui concerne la mortalité (Figure 1B).

Le pronostic pour le cancer du sein varie beaucoup. Plusieurs caractéristiques et critères doivent être pris en considération. Il y a tout d'abord les cancers *in situ* ou non-invasifs. Ces cancers demeurent bien délimités à la membrane basale. On retrouve également les cancers dits "invasifs", qui comme leur nom l'indique, possèdent la capacité de dissémination aux tissus normaux adjacents. Dans ce type de cancer, on retrouve les néoplasmes tubulaires qui sont les plus fréquemment observés chez la femme (50 à 80%) et les lobulaires infiltrants qui occupent de loin la deuxième position (5 à 15%) (6). Le pronostic peut également être éclairé par le niveau de différenciation de la tumeur. Lorsque celle-ci est entre autre composée de plusieurs glandes, on dit de cette tumeur qu'elle est différenciée et donc de bas grade (grade I). À l'opposé, une tumeur dont les cellules sont très peu différenciées se voit conférer un grade III, allant de pair avec un mauvais pronostic. Une stadification TNM quelque peu différente de celle utilisée pour le cancer du poumon, mais également basée sur la taille de la tumeur, les ganglions touchés et la présence ou non de métastases à distance, est aussi prise en compte (7). Tout comme pour le cancer du poumon, les traitements les plus couramment utilisés contre le cancer du sein sont la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Lorsqu'il est question de cancers invasifs, la chirurgie est pratiquement toujours suivie d'une séance de radiothérapie. L'expression de certains marqueurs peut également guider le diagnostic et le traitement. Certaines tumeurs appelées "triples négatives", n'expriment pas les récepteurs pour l'œstrogène (ER) et la progestérone (PR) et ne surexpriment pas le récepteur de croissance épidermique 2 (Her-2/*neu*), ce qui corrèle avec un mauvais pronostic et peu d'opportunités de traitement. À l'opposé, les individus dont les tumeurs expriment ER et PR peuvent

recevoir un traitement anti-hormonal et celles exprimant Her-2/*neu* sont éligibles à un traitement utilisant un anticorps (Ac) monoclonal spécifique à cette molécule, le trastuzumab (Herceptin®) (8).

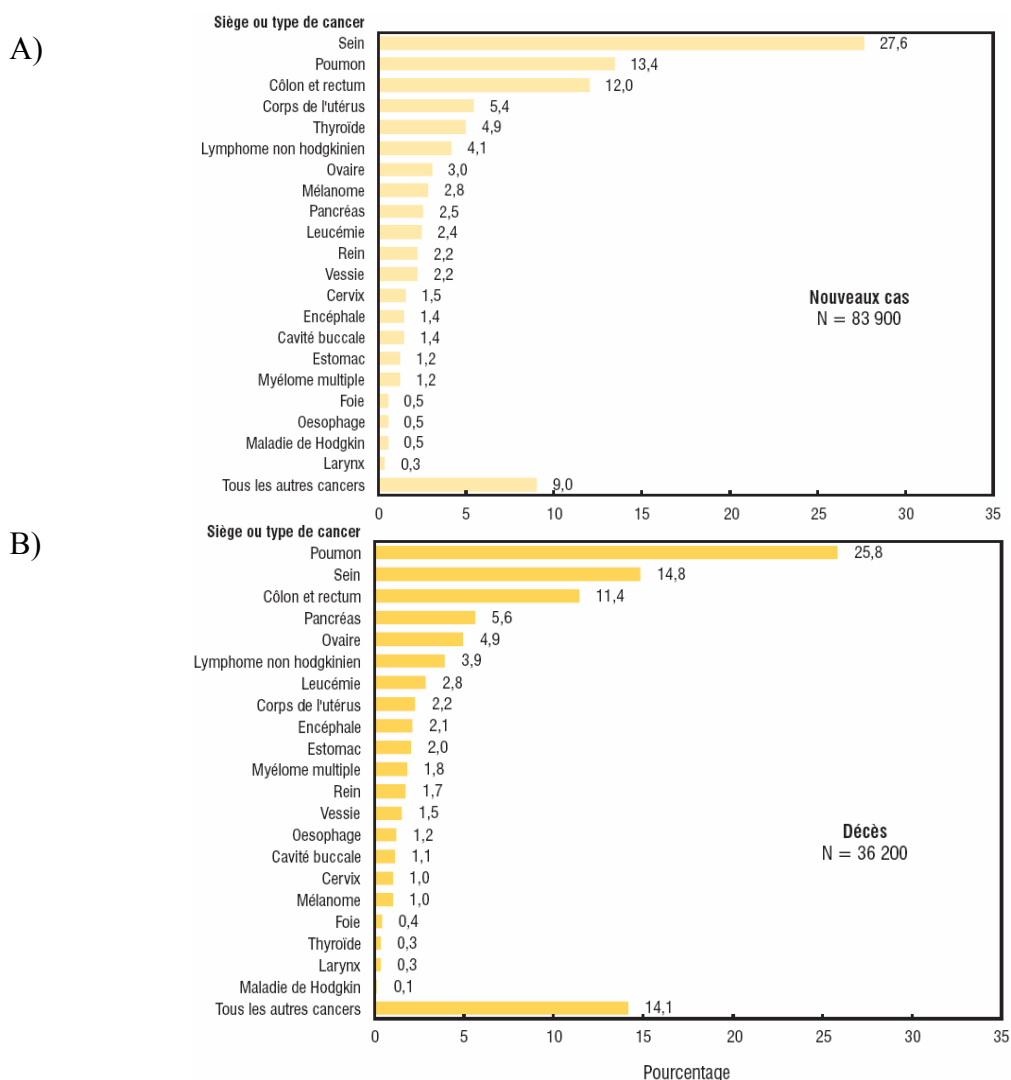


Figure 1. Répartition en pourcentage du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez les femmes, au Canada en 2010

Légende : Figure adaptée du document *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*, émit par la Société canadienne du cancer en collaboration avec Statistique Canada, les registres du cancer des provinces et des territoires et l'Agence de la santé publique du Canada (1).

A) Répartition des nouveaux cas de cancers diagnostiqués chez les femmes au Canada en 2010. **B)** Répartition des décès reliés aux différents types de cancer chez les femmes au Canada en 2010.

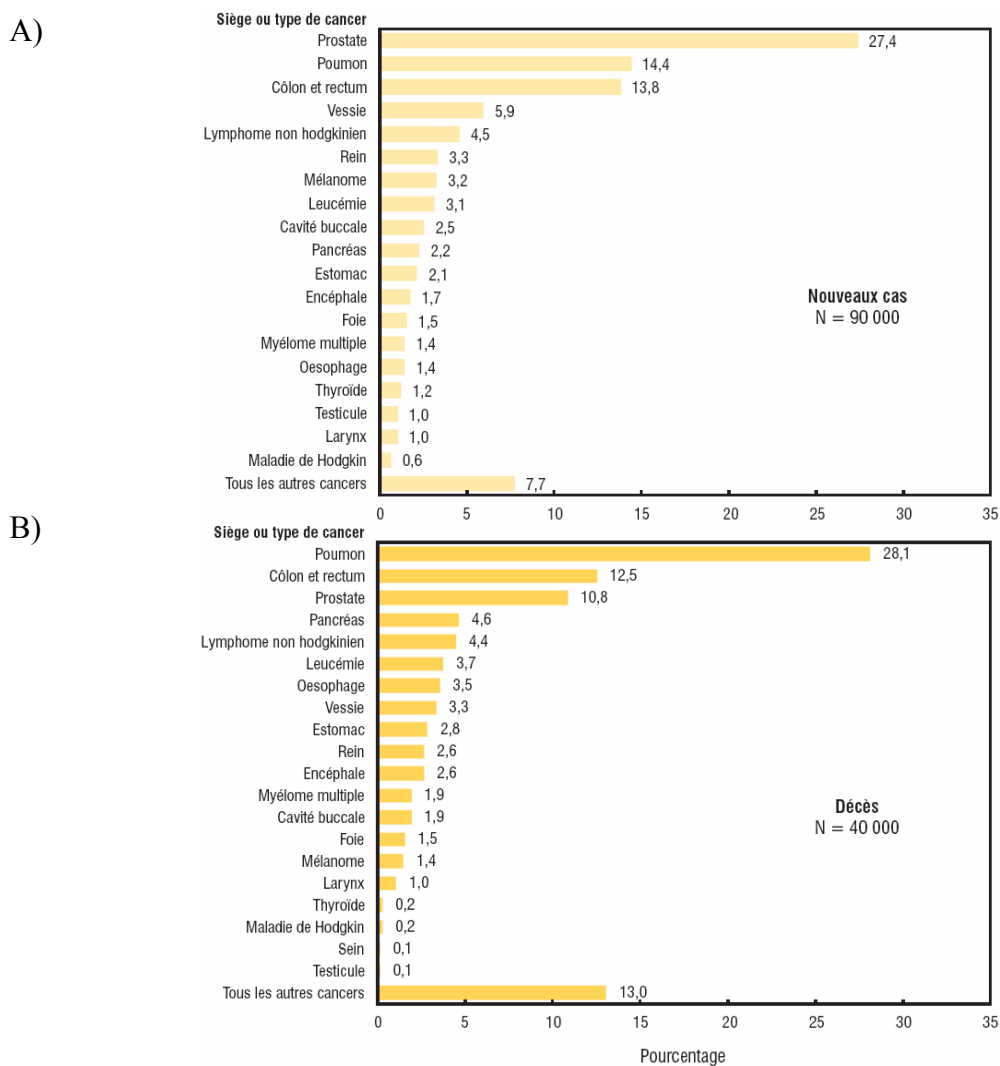


Figure 2. Répartition en pourcentage du nombre estimatif de nouveaux cas et de décès pour certains cancers, chez les hommes, au Canada en 2010

Légende : Figure adaptée du document *Statistiques canadiennes sur le cancer 2010*, émit par la Société canadienne du cancer en collaboration avec Statistique Canada, les registres du cancer des provinces et des territoires et l'Agence de la santé publique du Canada (1).

A) Répartition des nouveaux cas de cancers diagnostiqués chez les hommes au Canada en 2010. **B)** Répartition des décès reliés aux différents types de cancer chez les hommes au Canada en 2010.

1.1.2 Occurrences du cancer

Plusieurs événements peuvent être imputables au fait qu'une cellule normale se transforme en cellule hautement maligne. Ces événements peuvent varier selon l'organe touché et une accumulation de ces événements peut mener à un état malin. Pour la mise en contexte de ce projet et sa compréhension, il ne sera pas nécessaire d'expliquer en détail ces événements, mais plutôt de faire un survol basé sur la classification établie par Hanahan et Weinberg (9). Cette classification rassemble en 6 catégories les différents événements pouvant engendrer, chez une cellule normale, un état cancéreux et contribuer à ses fonctions.

Les six événements

La première caractéristique est l'indépendance aux signaux de prolifération. Cette indépendance peut provenir du fait que la cellule tumorale soit autosuffisante dans la production de facteurs de croissance et sensible à l'action de ces derniers. Il se peut également que la cellule présente une surexpression de certains récepteurs de facteurs de croissance augmentant ainsi sa sensibilité à la présence de ces derniers (10). Des mutations affectant des molécules participant aux voies de signalisation induites par les facteurs de croissance peuvent également expliquer cette indépendance (11).

Le deuxième élément de la classification est l'insensibilité aux inhibiteurs de prolifération qui peut également se traduire par des mutations affectant certains circuits ayant comme fonction première de stopper l'entrée ou la progression de la cellule dans le cycle cellulaire. Un bon exemple est la protéine du rétinoblastome (Rb) qui, lorsque phosphorylée, bloque la prolifération en empêchant la progression dans le cycle cellulaire (12). Ce circuit de signal de prolifération est fréquemment dérangé dans de nombreux cancers et mène à une prolifération incontrôlée (13).

On retrouve également en troisième position dans cette classification l'ignorance des signaux de mort programmée (apoptose). Un nombre important de stratégies peut être emprunté par une cellule cancéreuse pour s'évader des mécanismes de contrôle menant à l'apoptose. Les mutations affectant la protéine p53, un gène suppresseur de tumeurs, sont les plus fréquemment abordées. L'inactivation de la fonction de la protéine p53 a été rapportée dans plus de 50% des cancers humains et signifie la perte d'un mécanisme important dans le repérage des dommages à l'ADN et l'apoptose qui s'en suit (14).

En quatrième position se retrouve la possibilité de réplication sans limite qui provient de l'action des trois événements précédents. La plupart des cellules tumorales pouvant être cultivées *in vitro* semblent être immortelles. Cette condition témoigne bien de la capacité de réplication sans limite acquise *in vivo* durant la progression tumorale et essentielle au maintien du développement de l'état malin (15).

L'habileté à développer un réseau sanguin fait également partie de cette classification et se retrouve en cinquième position. Cette capacité provient généralement d'une surexpression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) qui vient agir comme signal pro-angiogénique ou encore d'une diminution des inhibiteurs de l'angiogénèse (16).

Le sixième événement est la capacité d'évasion (métastase). Il s'agit d'un processus très complexe dont les déterminants génétiques et biochimiques ne sont pas encore tout à fait bien compris. Des changements dans les molécules d'adhésion ou dans l'expression de certaines protéases sont souvent imputables à l'acquisition de cette capacité (9). Le processus de métastases des tumeurs primaires est la cause de 90% de la mortalité attribuable au cancer (17).

Bien que cette classification ait été établie depuis plus d'une décennie, elle demeure pourtant toujours d'actualité. Récemment, une modifiée a été proposée pour y apporter la contribution possible d'un septième événement : l'inflammation (18).

Le septième événement

L'inflammation est une cascade d'événements orchestrés par le système immunitaire visant à combattre les premières étapes d'une infection et initialiser la réparation tissulaire. Cette cascade implique l'intervention précoce de certains globules blancs dont les macrophages et les neutrophiles ainsi que l'action de certaines cytokines possédant un pouvoir chimioattractant, les chimiokines. L'inflammation peut être sous forme aiguë pour ensuite se résorber, ou sous forme chronique lors de l'activation continuelle de la réponse immunitaire, suite à la persistance d'un pathogène ou une maladie auto-immune (19). L'inflammation chronique peut causer la fibrose d'un tissu, suite à la prolifération non-contrôlée des fibroblastes et la surproduction de collagène résultant de la présence continuelle des chimiokines pro-inflammatoires. Ce genre de dommage peut contribuer au développement d'un état malin. Il en est ainsi pour les infections virales chroniques comme les hépatites qui peuvent mener à la formation de carcinomes hépatiques. Ce même effet est également observé lors d'infection bactérienne comme c'est le cas pour *Helicobacter pylori* qui peut mener au développement d'un cancer gastrique (18).

L'inflammation peut également survenir plus tard dans le cheminement malin et être à l'origine non pas du développement de la tumeur primaire, mais des métastases, suite à la sécrétion de différentes cytokines pouvant favoriser ce processus (20). Il a récemment été démontré dans le cancer du pancréas et dans le mélanome que les cellules tumorales peuvent exprimer à leur surface certains récepteurs de chimiokines. La présence de ces récepteurs pourrait favoriser la migration des cellules tumorales vers un foyer secondaire où se trouve un gradient de la chimiokine correspondante au récepteur (21, 22).

Ainsi, suite à la mise en évidence du rôle important de l'inflammation dans le cancer, une nouvelle classification a récemment été proposée et est présentée en Figure 3. Cette nouvelle classification souligne le rôle potentiel du système immunitaire dans le

développement et la progression des néoplasmes, rôle qui avait été complètement ignoré par Hanahan et Weinberg.

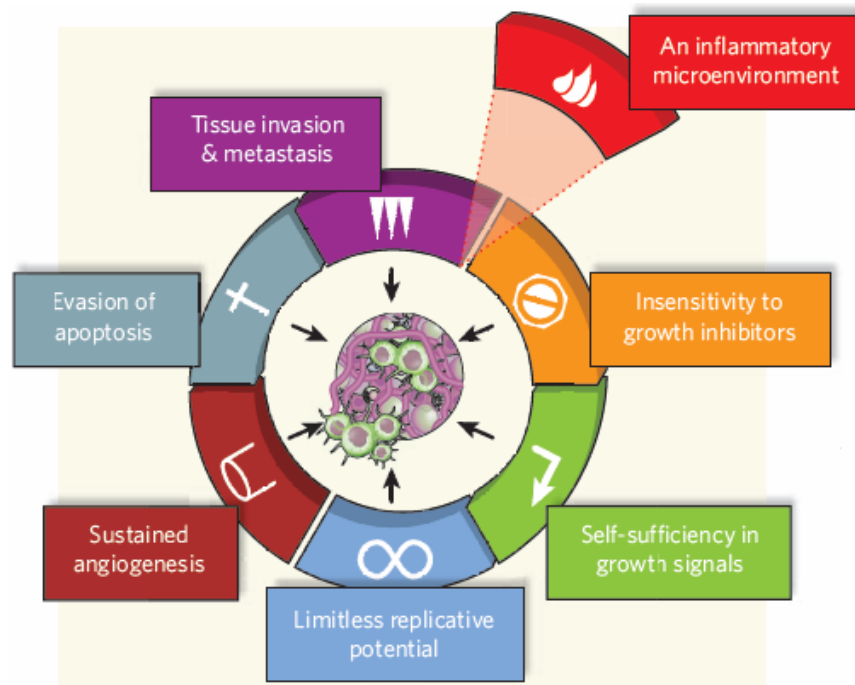


Figure 3. Les 7 événements caractéristiques au cancer selon Hanahan, Weinberg et Mantovani

(Figure adaptée de (20))

Légende : Classification proposée pour les différents mécanismes pouvant mener au cancer, selon leur mode d'action. Cette classification comprend 7 catégories. Elle présente un ensemble des fonctions acquises par les cellules cancéreuses durant leur développement.

1.2 Le système immunitaire et le cancer

1.2.1 L'immunosurveillance

L'implication de l'inflammation dans la formation et la progression du cancer témoigne d'un certain lien entre le système immunitaire et le cancer. Néanmoins, ce lien n'est pas que néfaste. Vers la fin des années 50, Burnet et Thomas ont proposé l'hypothèse d'immunosurveillance, qui confère aux lymphocytes T le rôle de "surveillants" capables de reconnaître et détruire les cellules transformées. Ce rôle de sentinelle protégerait l'hôte contre l'apparition de tumeurs cliniquement détectables (23). Faute de preuve, cette hypothèse fut critiquée et jamais vraiment confirmée. L'arrivée de la souris nude ne possédant pas de thymus, donc produisant très peu de lymphocytes T, est venue renforcer la critique. L'utilisation de ces souris n'a démontré aucune différence statistique lors de la comparaison du développement de tumeurs spontanées (induites chimiquement et non virales) chez les souris nude avec celui des souris possédant leur pleine capacité immunitaire (24). Suite à ces expérimentations, le concept d'immunosurveillance a été associé au développement de tumeurs à étiologie virale seulement. C'est dans les années 90 que le concept est revenu en force, suite à la démonstration de l'importance de l'interféron- γ (IFN- γ) et la perforine dans la protection contre les tumeurs chimiquement induites chez la souris. C'est grâce à l'utilisation de souris mutées pour l'un ou l'autre de ces gènes, empêchant ainsi l'expression de ces derniers, qu'il a été montré que la réponse immunitaire permettait une protection contre le développement de tumeurs spontanées (25). Les modèles murins ont également servi à démontrer l'importance des cellules immunitaires de la réponse innée comme les *natural killer cell* (NK) qui, suite à leur ablation physique ou fonctionnelle, provoquaient également une sensibilité au développement tumoral (25).

Parallèlement, des preuves cliniques de la protection du système immunitaire contre le développement de tumeurs ont également été mises en évidence chez l'humain. Spécifiquement, des patients immunosupprimés suite à une transplantation rénale, ont affiché un risque de 2 à 5 fois plus élevé de développer un cancer. Parmi ces cancers, on

retrouvait des cancers du poumon, du colon, de la prostate, des testicules et du larynx ainsi qu'un risque encore plus élevé (10 fois) pour des cancers de la peau (non-mélanome), du rein et des glandes endocrines (26). Bien qu'une augmentation dans l'incidence des lymphomes chez ces patients immunosupprimés ait été également observée, la plupart des cancers cités précédemment ne sont pas d'étiologie virale. La cohorte de patients utilisée pour cette étude s'échelonnait sur une vingtaine d'année, ce qui lui conférait un suivi à long terme. Ces observations ont aussi été confirmées par d'autres études s'échelonnant également sur une longue période, et ont permis de valider le concept de surveillance du système immunitaire chez l'humain (27).

Finalement, dans l'étalement de la preuve de l'immunosurveillance, on retrouve l'étude de l'infiltrat immunitaire des tumeurs solides. Plusieurs études ont démontré que l'infiltration tumorale de lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires de type 1 (Th1) et de lymphocytes T CD8⁺ (T CD8⁺) corrèle généralement avec un bon pronostic. Cette observation a été faite chez plusieurs cancers solides dont le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon, du rein, du colon, de la prostate, de la vessie, le mélanome et les cancers buccaux (28-37).

1.2.2 L'immunoédition

Bien qu'il ait été prouvé que le système immunitaire offre une protection contre l'émergence de tumeurs par l'immunosurveillance, la preuve a également été faite qu'il pouvait en favoriser le développement. Cet aspect a été souligné précédemment dans les différents mécanismes pouvant favoriser le développement et l'évasion tumorale induits par l'inflammation. Cette dualité retrouvée dans les interactions entre le système immunitaire et la tumeur a donné naissance à une modification dans l'hypothèse d'immunosurveillance. Cette dernière a été remplacée par le concept plus raffiné de l'immunoédition (25). La notion d'édition est ici utilisée pour décrire l'action modulateur positive ou négative que

peut exercer le système immunitaire sur la tumeur. Trois phases ont été décrites comme les principaux événements caractérisant l'immunoédition : l'élimination, l'équilibre et l'évasion (38). Ces 3 phases sont connues sous l'appellation des 3 "E" et sont présentées schématiquement en Figure 4.

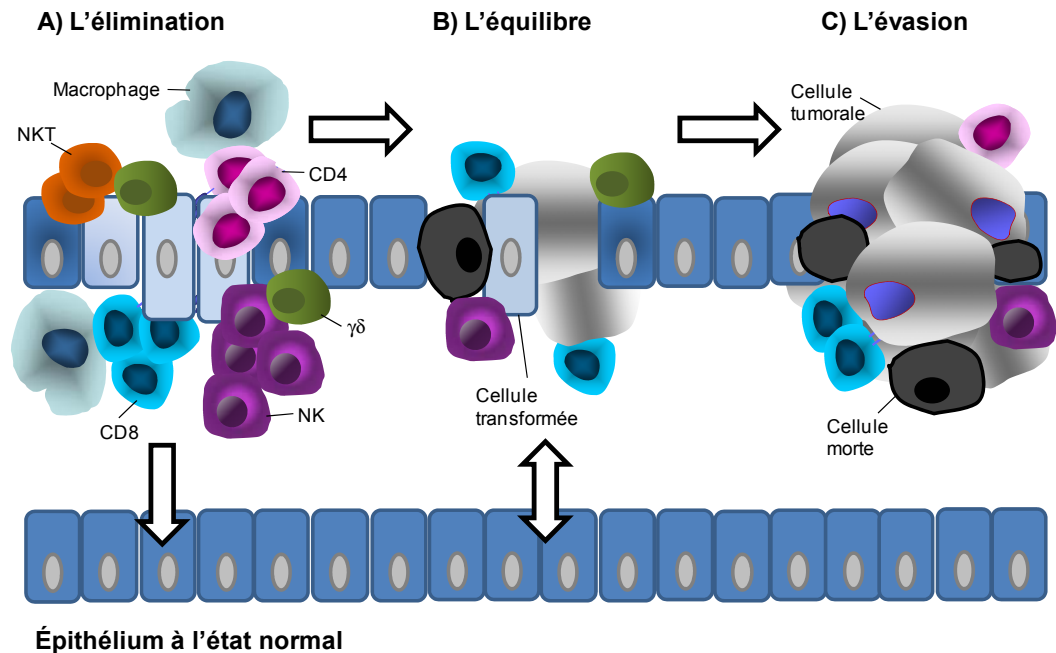


Figure 4. Les 3 phases constituant l'immunoédition dans le cancer

Légende : Représentation schématique des 3 phases de l'immunoédition. **A)** Première phase, l'élimination; les différentes composantes du système immunitaire reconnaissent et éliminent les cellules transformées. **B)** Deuxième phase, l'équilibre; les cellules immunitaires gardent les cellules cancéreuses confinées et réprimées. **C)** La troisième phase, l'évasion; phase où le système immunitaire n'arrive plus à contrôler la prolifération des cellules cancéreuses. Comme l'indique les flèches blanches, il est possible de revenir à un état normal à partir de la phase d'élimination ou d'équilibre, sinon il peut y avoir progression d'une phase à l'autre.

1.2.2.1 L'élimination

La phase d'élimination constitue en soi l'immunosurveillance. Dans cette phase, on retrouve premièrement l'action du système immunitaire inné (NK, *Natural killer T cell* (NKT), cellules $\gamma\delta$ et macrophages) qui détecte la présence d'une prolifération non-souhaitée attribuable, par exemple, à une perturbation de l'environnement stromal. C'est le début d'une réaction inflammatoire. À ce moment peut survenir l'initiation d'un néoplasme suivant une réponse inflammatoire hors de contrôle (comme vu précédemment). Bien entendu, nous pouvons supposer que cet aboutissement n'est pas des plus fréquents. Normalement, l'action des différentes cellules du système inné sur place, combinée à la sécrétion d'IFN γ va inciter l'infiltration de d'autres cellules immunitaires (NK, macrophages et cellules dendritiques) (25). Cette infiltration aura pour effet d'augmenter la production d'IFN γ ainsi que l'activité anti-tumorale des cellules du système immunitaire inné et engendrer un relâchement de différents antigènes propres à la tumeur. L'IFN γ induira également la production de la chimiokine *protéine-10 induite par l'interféron- γ* (IP-10) qui attirera les cellules immunitaires dans l'environnement tumoral, mais exercera également une action angiostatique (39). La réponse du système inné ne sera pas approfondie davantage. Bien que cette dernière soit d'un grand intérêt et d'une grande complexité, elle n'est présentement pas nécessaire à la compréhension de cette étude.

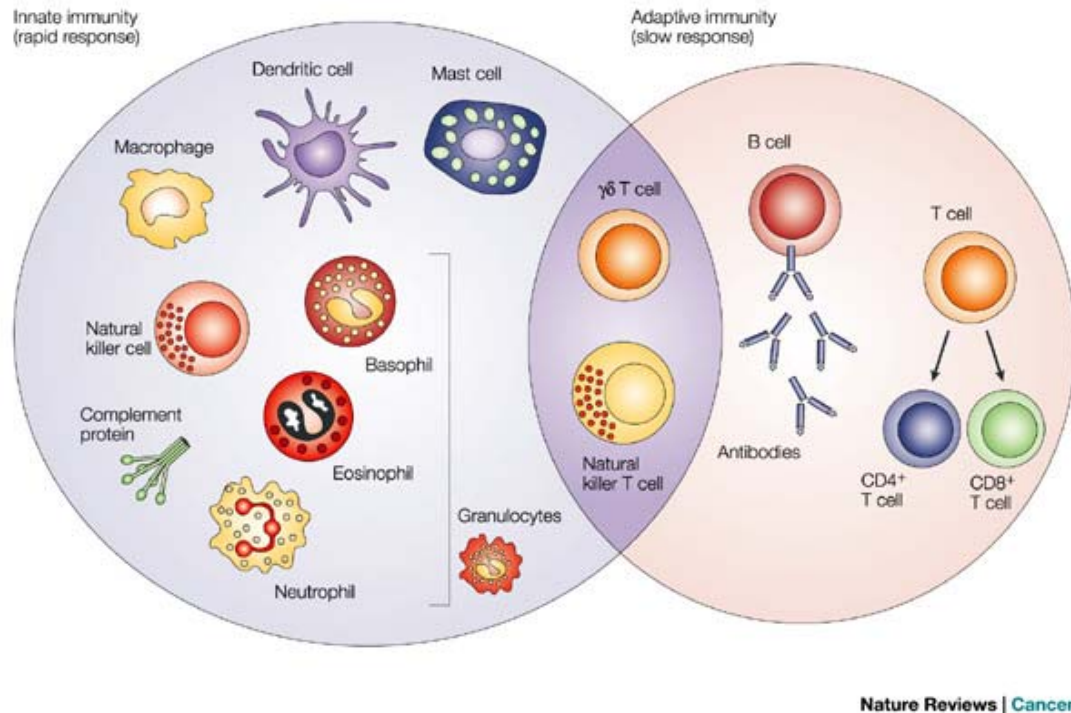


Figure 5. Classification des cellules du système immunitaire selon leur appartenance à l'immunité innée ou adaptative.

(Figure tirée de (40))

Légende : La réponse immunitaire innée est une réponse de première ligne. Elle met en scène les cellules *natural killer*, les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les éosinophiles, les basophiles et les *mast cells*. Le système du complément fait également partie de la réponse innée. La réponse immunitaire adaptative englobe pour sa part les lymphocytes B et T, CD8⁺ et CD4⁺. Elle se déroule en second plan, suite à l'activation des différentes cellules de la branche innée. Jusqu'à présent, il s'agit de la seule branche du système immunitaire chez laquelle la faculté de mémoire a été prouvée. Les *Natural killer T cells* et les cellules $\gamma\delta$ qui sont des cellules cytotoxiques sont ici classées à l'interface de la réponse innée et adaptative (40). Les cellules dendritiques sont nécessaires aux 2 branches de la réponse immunitaire et permettent de faire le pont entre les 2.

La réponse antigénique

Les antigènes relâchés dans le milieu, suite à l'action des cellules immunitaires de la branche innée, seront récupérés par les cellules dendritiques (DC), suite à la phagocytose ou l'endocytose des particules tumorales. Les DC ainsi activées se dirigeront ensuite vers les ganglions lymphatiques où elles pourront activer des composantes de la réponse adaptative (Figure 5), les lymphocytes T. Les DC ayant engouffré des antigènes libérés par la tumeur peuvent en présenter des sections (peptides) grâce à leur complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II. Les CMH de classe II sont normalement exprimés seulement à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (APC) (DC, macrophages et lymphocytes B) (41-43). Les lymphocytes T $CD4^+$ (T $CD4^+$) possèdent un récepteur des cellules T (TCR) capable de reconnaître spécifiquement un peptide présenté par CMH de classe II (Figure 6A) (19). Cette reconnaissance provoque l'activation du T $CD4^+$, lui conférant ainsi un profil de lymphocytes auxiliaires (Th) de type Th1, Th2, Th17 ou lymphocyte T de type régulateur (Treg). Les Treg et les Th17 seront abordés plus tard dans la SECTION1. Suite à cette activation, le Th sécrètera différentes cytokines. Les Th1 sécrèteront de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'IFN- γ pour aider à la réponse antigène-spécifique des T $CD8^+$ dite "à médiation cellulaire" (19). Les Th2 favoriseront pour leur part la réponse humorale. L'aboutissement de la réponse humorale est la production d'anticorps par les lymphocytes B transformés en plasmocytes. La production des cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 est typiquement associée à une réponse Th2 (19).

Avec l'aide des Th1 et des cytokines sécrétées, les DC pourront également procéder à l'activation des T $CD8^+$. Le TCR des T $CD8^+$ reconnaît spécifiquement des peptides présentés à la surface des molécules de CMH de classe I (Figure 6B). Ces peptides sont plus courts (normalement entre 8 et 10 acides aminés (a.a)) que ceux présentés par les CMH de classe II (plus de 13 a.a.) (44). Les molécules de CMH de classe I sont retrouvées à la surface de la plupart de cellules, y compris les DC et les cellules cancéreuses (19). La présentation de peptides par CMH-I présentée en Figure 6B, est la présentation traditionnelle suivant la dégradation d'une protéine endogène. Les peptides provenant des

fragments de cellules tumorales engouffrées par la DC proviennent, pour leur part, de protéines exogènes à la DC. L'activation des T CD8⁺ par CMH-I se fera donc suite à une présentation dite "croisée" (Figure 7) (45). Ce type de présentation est majoritairement assuré par les DC *in vivo*, mais peut être effectué *in vitro* par les macrophages et les lymphocytes B (46, 47). La présentation croisée confère aux DC la capacité de présenter des protéines endogènes de cellules infectées ou de cellules cancéreuses et ainsi provoquer la prolifération de T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre ces cellules (45, 48, 49).

Suite à l'activation du système immunitaire adaptatif, les T CD8⁺ dirigés spécifiquement contre les antigènes dégagés des cellules tumorales pourront éliminer ces dernières suite à une interaction TCR-peptide-CMH (Figure 6B). Cette réponse anti-tumorale peut être médiée par la voie cytolytic granzyme/perforine ou par le système CD95 (Fas/FasL) d'induction de mort par apoptose (19).

Ainsi, suite à l'interaction des différentes cellules immunitaires appartenant à la réponse innée et adaptative et l'action de l'IFN- γ , la phase de l'élimination résulte habituellement en une éradication des cellules transformées (50).

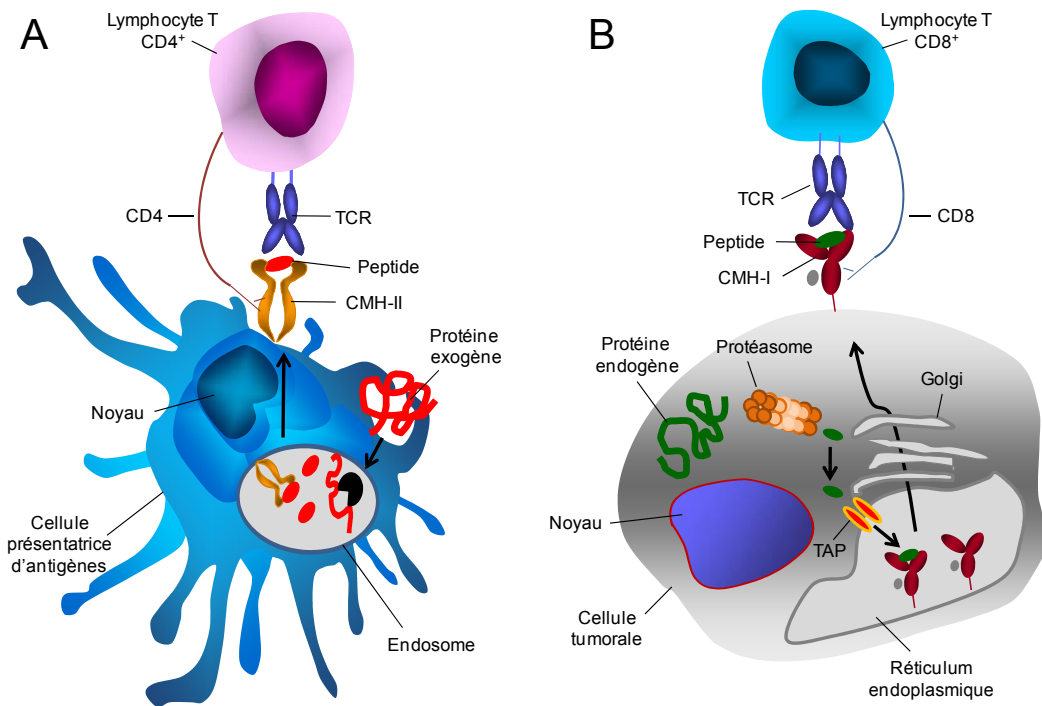


Figure 6. Présentation antigénique classique par CMH de classe I et classe II

Légende : A) Apprêtement d'une protéine exogène présentée par CMH de classe II.

La protéine exogène est internalisée par endocytose ou phagocytose par une cellule présentatrice d'antigènes. Parmi ces cellules, on retrouve les cellules dendritiques et les macrophages. Une fois à l'intérieur, la protéine chemine à travers la voie endosomale où elle est dégradée en peptides. Les peptides sont chargés sur les CMH de classe II présents dans ces vésicules. Le complexe peptide/CMH-II est ensuite acheminé à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes pour être présenté et reconnu par le TCR du lymphocyte TCD4⁺ (51, 52). Une protéine du cytoplasme peut aussi être apprêtée pour être présentée par CMH-II suite à l'autophagie; ce concept ne sera cependant pas développé davantage (53). **B) Apprêtement d'une protéine endogène présentée par CMH de classe I.** Exemple illustré avec une cellule tumorale, mais s'applique à toutes cellules possédant des CMH de classe I. Les protéines endogènes sont ciblées pour la dégradation

par protéasome selon leur durée de demi-vie ou suite à une erreur de synthèse ou de repliement lors de l'élaboration des protéines (54, 55). Les peptides résultant de cette dégradation pénètrent à l'intérieur du réticulum endoplasmique, par le transporteur associé à la présentation antigénique (TAP), pour être ensuite chargés sur les molécules de CMH-I (56). Le complexe peptide/CMH-I est ensuite acheminé à la surface de la cellule présentatrice d'antigènes pour être présenté et reconnu par le TCR du lymphocyte TCD8⁺ (57).

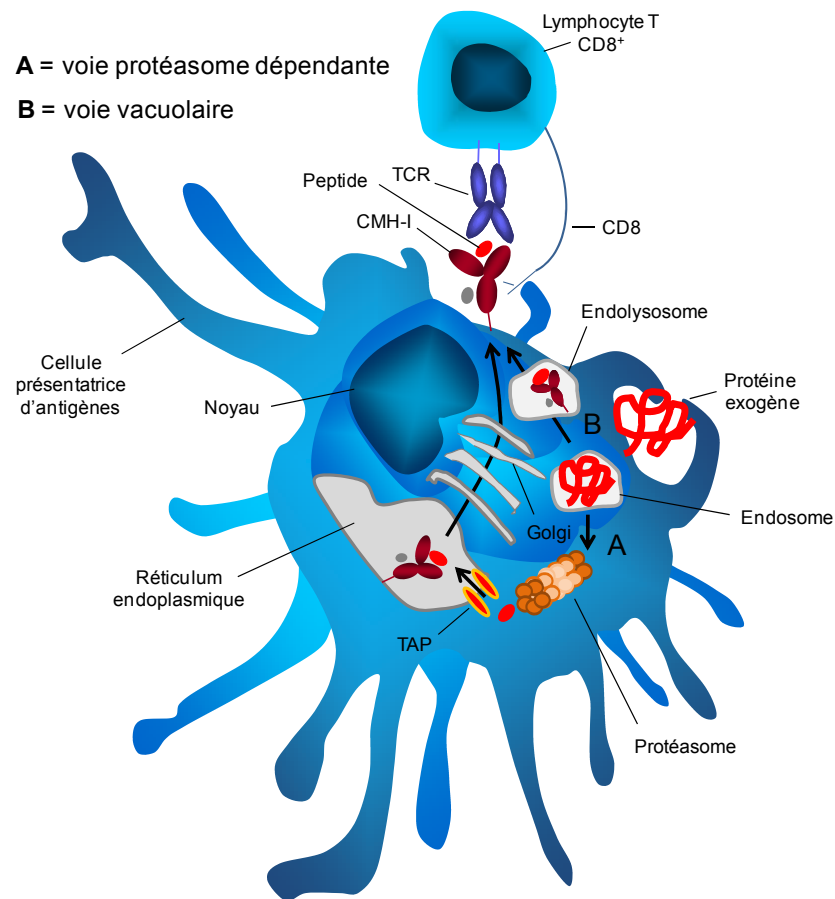


Figure 7. Présentation croisée d'une protéine exogène par CMH de classe I

Légende : Description sommaire des mécanismes possibles de la présentation croisée d'une protéine exogène selon 2 voies, résumés par *Burgdorf et Kurts* (58). **A) Voie protéasome dépendante.** La protéine exogène est exportée de l'endosome vers le cytoplasme pour y être dégradée en peptides par le protéasome. Les peptides peuvent ensuite gagner le réticulum endoplasmique par le transporteur TAP pour y être chargés sur les CMH-I, comme vu précédemment, ou regagner l'endosome ayant acquis certaines molécules du réticulum endoplasmique et y être chargés sur les CMH-I. **B) Voie**

vacuolaire. L'antigène exogène est dégradé en peptides par les protéases se trouvant dans l'endosome pour être directement chargés sur les CMH-I.

1.2.2.2 L'équilibre

La seconde phase du modèle d'immunoédition est l'équilibre. Comme le montre la Figure 4, il peut arriver que la phase d'élimination ait failli à l'éradication totale des cellules transformées et qu'il en persiste quelques unes dans l'environnement. Pendant des mois, voir même des années, le système immunitaire peut contenir ces cellules et les garder en latence. Lors du troisième symposium annuel du *Canadian Cancer Immunotherapy Consortium* (CCIC) de 2010, le Dr. Drew M. Pardoll, a cité un excellent exemple témoignant de la phase d'équilibre et de l'importance de la bonne condition du système immunitaire dans cette phase. Il était question de deux patients ayant reçu une greffe de rein provenant d'un même donneur. Suite à cette greffe, les receveurs ont tous deux développé un cancer du rein. L'histoire clinique du donneur a, par la suite, révélé que ce dernier avait jadis été atteint d'un cancer, qu'il en était guéri et n'avait jamais eu de récurrence. Cet exemple reflète bien l'état d'équilibre qui était maintenu chez ce donneur et qui a été brisé lorsque les organes touchés par des cellules transformées ont été transplantés chez des receveurs immunosupprimés. Il faut cependant préciser que cet exemple, bien que très intéressant, est basé sur des observations cliniques et il ne fait pas la démonstration mécanistique d'un état d'équilibre.

C'est par l'utilisation du modèle murin que la preuve de la phase d'équilibre a été établie par *Koebel et al.* (59). Plus de 200 jours suivant l'injection de 3'-methylcholanthrene (MCA), visant à l'induction d'un carcinome par traitement chimique, *Koebel et al.* ont observé parmi leur cohorte, des souris dont la masse tumorale était à peine palpable et restreinte au site d'injection. Ces souris ne présentaient pas de croissance tumorale, mais plutôt un état d'équilibre. Pour tenter de briser cet équilibre, certaines souris

ont reçu multiples injections d'anticorps bloquant l'action de différentes cellules immunitaires. La reprise de croissance tumorale a été observée chez la moitié des souris ayant reçu des anticorps bloquant l'action des T CD8⁺, T CD4⁺, de l'IFN- γ ou l'IL-12. L'équilibre fût par contre maintenu chez les souris ayant reçu des injections d'anticorps ciblant l'action des NK ou d'anticorps contrôles, établissant par le fait même la non-nécessité de la réponse innée dans ce modèle. Ainsi, *Koebel et al.* ont démontré l'établissement d'un état d'équilibre et le bris de cet état par l'abolition de l'action du système immunitaire adaptatif, mettant ainsi en évidence l'importance de la réponse adaptative dans le maintien de la phase d'équilibre (59).

La théorie de l'évolution développée par le Dr. Charles Darwin en 1859 qui affirme que la sélection naturelle se fait par l'acquisition de caractères héréditaires, privilégiant l'adaptation au milieu, est souvent citée pour expliquer la phase d'équilibre. La théorie de la sélection permet également de dépeindre le passage vers la phase de l'évasion (38, 60). La sélection de certaines populations clonales de cellules tumorales proposée par Norwel en 1976 fait suite à cette théorie (61). La phase d'équilibre est maintenue aussi longtemps que les cellules transformées émergentes peuvent être détruites ou contenues par le système immunitaire. Suite à différents événements génétiques et environnementaux traités plutôt dans les 7 événements menant au cancer, certaines cellules tumorales peuvent acquérir la capacité d'échapper au système immunitaire. Il y a alors transition vers la phase d'évasion (38).

1.2.2.3 L'évasion

La phase d'évasion (Figure 4C) peut être provoquée par l'addition de différents événements qui peuvent permettre à la cellule transformée d'échapper à la reconnaissance ou à l'élimination par le système immunitaire. La phase d'échappement touche à la fois la réponse innée et la réponse adaptative. Pour les besoins de cette étude, seuls les mécanismes touchant la réponse adaptative seront traités.

Perte totale ou partielle de la présentation antigénique par CMH de classe I

Plusieurs mécanismes peuvent être déployés par la cellule tumorale afin d'échapper à la reconnaissance et à l'élimination par le système immunitaire. Le premier mécanisme est la perte totale ou partielle de la présentation antigénique par CMH de classe I (62). Comme il a été discuté et présenté à la Figure 6B, des protéines endogènes peuvent être présentées à la surface des cellules tumorales et être reconnues par les T CD8⁺ qui pourront engendrer la mort de la cellule tumorale. La présentation antigénique peut subir des transformations fonctionnelles la rendant ainsi moins inefficace et permettant l'évasion de la cellule tumorale. La perte totale des molécules de CMH-I est souvent attribuée à une mutation affectant la structure de la β 2-microglobuline (63, 64). Un défaut de structure empêchant la liaison de cette dernière avec le CMH-I a pour résultat la perte d'expression du complexe. Cette perte totale de l'expression des molécules de CMH-I a souvent été rapportée dans le cancer du colon et mélanome (65). Une baisse d'expression des différentes molécules constituant la machinerie servant à l'apprêtement antigénique, peut également être associée à une diminution ou la à perte totale de l'expression des CMH-I à la surface. La diminution ou la perte d'expression des molécules de TAP ainsi que certaines sous-unités du protéasome (LMP2 et 7) ont été rapportées dans les cancers touchant la tête et le cou (66). Ces observations ont été reproduites dans les cancers de la prostate et du rein (67, 68). Lorsque la perte des capacités de présentation par le CMH de classe I est fonctionnelle, comme c'est le cas dans les cancers cités ci-dessus, elle peut être restaurée par l'action de l'IFN- γ . Par contre, lorsqu'il s'agit d'un problème structural irréversible, suite à une mutation sévère, l'exposition à l'IFN- γ n'a pas d'effet (69).

Production de molécules pro-tumorales par les cellules tumorales

Les cellules tumorales peuvent aussi produire différentes molécules capables d'inhiber l'action du système immunitaire favorisant ainsi leur évasion. Parmi ces

molécules immunosuppressives, on retrouve le facteur de croissance transformant- β (TGF- β) qui favorise l'angiogénèse et l'immunosuppression, l'IL-10 qui inhibe aussi la réponse anti-tumorale des T CD8⁺ et l'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui induit la déplétion du tryptophane du milieu. Le tryptophane étant un a.a. essentiel à l'activation de lymphocytes T (70-72), la présence d'IDO constitue donc un facteur immunosuppresseur. Les cellules tumorales peuvent également exprimer des molécules de CMH de classe I *Human leukocyte antigen* (HLA)-G (membranaires et solubles). Ces molécules sont des CMH non-classiques et possèdent un pouvoir d'inhibition qu'elles exercent en liant directement les lymphocytes T, les macrophages, les DC et les NK. L'expression d'HLA-G a déjà été rapportée dans plusieurs tumeurs solides, dont les cancers du poumon, du sein, de la prostate, de l'ovaire et de la vessie. Elle est également exprimée dans les cancers endométriaux et colorectaux (73).

Infiltration de cellules immunitaires immunosuppressives dans l'environnement tumoral

Finalement, certaines cellules du système immunitaire peuvent également contribuer à l'évasion tumorale. Il a précédemment été rapporté que la présence de T CD8⁺ et de Th1 corrélait généralement avec un bon pronostic (28). Pour tirer ces conclusions, il est cependant important de bien définir le phénotype des T CD4⁺ retrouvés dans les tumeurs. Si la présence d'un profil Th1 peut être bénéfique pour la réponse anti-tumorale, celle d'un profil de lymphocytes T régulateurs (Treg) ne l'est peut-être pas. Les Treg sont des T CD4⁺ exerçant une activité suppressive sur les différentes cellules du système immunitaire. Ils ont premièrement été identifiés chez la souris qui, suite à l'ablation du thymus, développait des réactions auto-immunes touchant différents organes (74). Dr. S. Sakaguchi et ses collègues ont spécifiquement démontré que la déplétion des Treg était responsable de ces réactions auto-immunes (75). Ainsi, le rôle premier des Treg est le maintien de la tolérance immunitaire face aux cellules du "soi" et la tolérance aux composantes externes mais non-

pathologiques, comme les bactéries de la flore commensale, afin d'éviter les réactions auto-immunes et l'inflammation inappropriée (76). Les Treg expriment des niveaux élevés de la chaîne α du récepteur d'IL-2 (CD25) et expriment également le facteur de transcription *forkhead box P3* (Foxp3) lorsqu'ils proviennent du thymus, et sont alors dits "naturels" (77, 78). Ce point peut porter à confusion car la littérature rapporte l'induction de Treg Foxp3⁺ à partir de T CD4⁺CD25⁻ non suppresseurs, suite à l'exposition à de hautes concentrations TGF- β sécrétées par les tumeurs *in vitro* chez l'humain et *in vivo* chez la souris (79). Par ailleurs, l'expression de Foxp3 est également retrouvée au niveau des cellules épithéliales, dont celles du poumon et du sein, où il a entre autre été reconnu comme un gène suppresseur de tumeur (80, 81).

La suppression médiée par les Treg Foxp3⁺ peut être contact dépendant, par la liaison des molécules d'activation CD80 et CD86 (B7) exprimées à la surface des lymphocytes T effecteurs et des APC (82, 83). Les Treg Foxp3⁺ peuvent aussi supprimer la réponse immunitaire par la sécrétion de l'IL-35, une cytokine de la famille de l'IL-12 (84). Les Treg Foxp3⁻, pour leur part, exercent leur activité suppressive par la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β (85, 86). En général, les Treg peuvent induire l'apoptose chez les autres lymphocytes T par la consommation excessive des cytokines disponibles (87). Ils peuvent également éliminer les lymphocytes T effecteurs par la voie cytolytique granzyme/perforine (88). Ce dernier mécanisme a, par ailleurs, été mis en évidence chez la souris, avec le modèle de mélanome B16, où il a été démontré que 5 à 30% des Treg Foxp3⁺, présents dans l'environnement tumoral, étaient positifs pour l'expression de granzyme/perforine et pouvaient induire la mort de NK et T CD8⁺ (89). Toujours dans le modèle murin, le groupe de Sakaguchi a démontré que la déplétion des Treg, grâce à un anticorps dirigé contre le CD25, augmente la réponse anti-tumorale des T CD8⁺ et engendre de l'auto-immunité. Cette démonstration a été réalisée avec la tumeur solide B16, mais également avec l'utilisation de cancers sanguins comme la leucémie et le myélome (90, 91). Une observation d'activité anti-tumorale similaire a été rapportée suite à une déplétion des Treg avec une chimiothérapie à la cyclophosphamide (92, 93). Chez

l'humain, la présence des Treg Foxp3⁺ a été rapportée dans différents cancers et un ratio à la baisse de T CD8⁺/ Treg Foxp3⁺ a été corrélé avec un mauvais pronostic, particulièrement dans les cancers gastriques, du sein et de l'ovaire (94-96).

On retrouve aussi dans l'environnement tumoral des cellules de la lignée myéloïde capables d'inhiber la réponse anti-tumorale. Ces cellules sont connues comme des cellules inhibitrices dérivées de précurseurs myéloïdes (MDSC) (97). Les MDSC sont des cellules immatures dont la maturation a été bloquée suite à diverses infections ou cancers (98). Il semblerait que ce soit l'inflammation, suite à la sécrétion de VEGF, IL-1 β et IL-6, qui soit responsable du recrutement des MDSC dans les tumeurs (99-101). Les Dr. V. Bronte et Dr. D. Gabrilovich ont activement contribué à l'étude des cellules MDSC (102). Le Dr. Bronte a démontré que les MDSC pouvaient inhiber l'activité des lymphocytes T en éliminant l'arginine du milieu, grâce à l'expression d'arginase; l'arginine étant un a.a essentiel à l'activation des lymphocytes (103). Dr. Gabrilovich et ses collègues ont démontré que les MDSC produisaient aussi des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) pouvant créer des dommages multiples au niveau génomique, protéique et cellulaire. Ils ont aussi montré qu'elles produisaient de l'oxyde nitrique (NO) qui nuit à l'interaction TCR-peptide-CMH (104). Dernièrement, il a été démontré, à l'aide de co-culture *in vitro*, que les MDSC pourraient diminuer l'expression du CD62L (L-selectin), une molécule permettant l'entrée dans les ganglions lymphatiques et exprimée sur les T CD8⁺ et CD4⁺ naïfs ainsi que sur les cellules mémoires centrales qui circulent de ganglion à ganglion (105). Un lymphocyte T est considéré comme naïf lorsque son TCR n'est pas entré en interaction avec un complexe CMH-peptide contre lequel il est spécifique.

La présence de cellules myéloïdes suppressives a été rapportée pour la première fois dans les modèles murins de cancer du poumon et du sein, il y a plus de 20 ans (106, 107). Plus de 10 ans se sont écoulés avant que le Dr. Gabrilovich et ses collègues rapportent, chez l'humain, une diminution des DC matures au profit de populations de DC immatures principalement chez les patients atteints de cancer buccaux, du sein ou des poumons (108). Ils ont démontré que ces cellules immatures inhibaient la réponse des T CD8⁺ contre des

antigènes et que la déplétion de cette population au sein des DC permettait la restauration de cette réponse. Lorsqu'ils ont tenté de caractériser le phénotype de ces cellules, ils ont constaté que ces dernières plutôt hétérogènes (108). Un problème majeur se posant avec les MDSC et souligné par le Dr. Bronte et ses collègues dans de leurs récentes revues de littérature est que les MDSC ont été beaucoup mieux caractérisées dans les cancers murins avec l'utilisation de marqueurs qui ne sont pas nécessairement retrouvés chez l'humain (109). La transposition des résultats de la souris à l'humain est donc plus difficile.

Finalement, on retrouve également au sein de certaines tumeurs des macrophages (TAM) qui n'exercent pas directement d'activité inhibitrice sur les cellules immunitaires, mais qui provoquent un environnement pro-angiogénique pour alimenter la tumeur suite à la sécrétion de TGF- β , VEGF, IL-8 et TNF- α , (97)

En conclusion, l'immunoédition dépeint parfaitement la dualité du rôle du système immunitaire dans la protection contre le développement d'un état malin et la contribution qu'il peut apporter à l'élaboration de cet état. Toute fonction exercée naturellement par les différentes composantes du système immunitaire est engagée dans l'esprit de préserver un équilibre; que ce soit par l'action des cellules immuno-suppressives telles les Treg pour préserver d'une réaction auto-immune, ou la réaction inflammatoire engendrée suite à une infection. Toutefois, lorsque ces réactions immunitaires ne sont pas bien contrôlées ou ne sont pas à propos, elles peuvent contribuer à l'initiation ou la propagation de cellules cancéreuses.

1.3 Les antigènes tumoraux

1.3.1 Définition

La partie précédente qui traitait des interactions entre le système immunitaire et les tumeurs a permis d'aborder le concept de présentation antigénique. Il a été souligné à maintes reprises que les T CD8⁺ avaient la capacité d'éliminer les cellules tumorales suite à la reconnaissance de peptides présentés par CMH-I à la surface de ces dernières. Ces peptides proviennent de la dégradation de protéines endogènes exprimées par les cellules tumorales (Figure 6B). Une protéine exprimée au niveau des cellules tumorales et absente ou faiblement exprimée dans les tissus normaux dérivés d'organes importants est connu sous l'appellation d'un antigène associé aux cellules tumorales (TAA). Le terme *antigène tumoral* est également utilisé. Pour être considéré comme tel, un TAA doit également être immunogénique. L'immunogénicité se définit comme la capacité de déclencher une réponse du système immunitaire, cellulaire et/ou humorale (19). Un TAA doit donc pouvoir être présenté aux cellules immunitaires et être reconnu par celles-ci. Comme il a également été souligné précédemment, des antigènes provenant de cellules tumorales peuvent aussi être libérés dans l'environnement tumoral et être récupérés par les APC pour être ensuite présentés sous forme de complexes peptides-CMH-II aux T CD4⁺ (Figure 6A). La partie précédente abordait aussi le concept de présentation croisée d'une protéine exogène par les CMH-I d'une APC, permettant ainsi aux TAA d'être récupérés par les APC pour être présentés aux T CD8⁺ afin d'activer ces derniers. Ainsi, un même TAA peut compter différents peptides pouvant être reconnus par les T CD8⁺ et les T CD4⁺.

Il y 20 ans était identifié le premier TAA dans le mélanome humain, par le groupe du Dr. Thierry Boon. Ils avaient démontré que cet antigène, le *melanoma-associated gene-1* (MAGE 1), pouvait être reconnu par les T CD8⁺. Ils avaient également démontré que cet antigène était exprimé par d'autres types de cancer, mais n'était pas retrouvé au niveau des différents tissus normaux testés par hybridation d'ARN de type *Northern* (110). En fait, en 2004, Dr. Pedro Romero définissait les qualités attribuées à l'antigène tumoral « idéal »

(111). En plus de son absence des tissus normaux, le TAA " idéal " doit être impliqué dans la progression tumorale. Ainsi en ciblant ce TAA, le système immunitaire contrecarre un mécanisme d'évasion tumorale. L'antigène doit également posséder des peptides pouvant être présentés par les types de CMH les plus fréquemment retrouvés dans la population et être reconnus à la fois par les T CD8⁺ et les T CD4⁺. Finalement, le TAA " idéal " doit être apprêter et présenter de façon optimale par les cellules cancéreuses afin de stimuler une forte réponse du système immunitaire et obtenir une réponse anti-tumorale importante (111). Bien entendu, aucun TAA ne possède l'entièreté de ces caractéristiques. Il devient alors important de cibler les caractéristiques énumérées ci-dessus par ordre d'importance. Ainsi aujourd'hui, selon la liste établie par les Dr. van der Bruggen et Dr. van den Eynde (112), on compte plus de 130 TAA. Cette liste constitue une banque de données où seuls les antigènes pouvant se conformer à 6 critères d'inclusion y sont admis. Ces critères sont énumérés au Tableau I.

**Caractéristiques admises pour la validation d'un antigène
tumoral candidat pour les lymphocytes T**

Des clones de lymphocytes T humains ou des lignées reconnaissant spécifiquement cet antigène ont pu être isolés,

Le peptide dérivé de cet antigène a été identifié et reconnu par les lymphocytes T,

La molécule HLA pouvant présenter le peptide dérivé de l'antigène a été identifiée,

Il existe des évidences que le peptide dérivé de cet antigène peut être apprêté et présenté par les CMH de cellules tumorales,

S'il s'agit d'un peptide pouvant être reconnu par les lymphocytes T CD8⁺, la caractérisation doit inclure le plus petit fragment d'antigène pouvant être présenté et reconnu, pour une concentration inférieure à 1 µM,

Le niveau d'expression de l'antigène dans les tumeurs et les tissus sains doit être documenté. Un antigène présentant une expression ubiquitaire amène le rejet de sa candidature comme antigène tumoral.

Ces caractéristiques aux nombres de 6 sont proposées par Van der Bruggen *et al.* Elles servent de "guide pratique" pour l'élaboration de la base de données peptidique des antigènes tumoraux, publiée sur le site internet du journal *Cancer Immunity* créé en 2001. La majorité des TAA admis dans cette base de données sont conformes aux 6 critères. La base de données est mise à jour sporadiquement.

Tableau I. Critères d'inclusion pour valider l'inscription d'un antigène dans la base de données d'antigènes tumoraux définis pour les lymphocytes T

Informations disponibles dans *Cancer Immunity* (112) C'est moi qui ai fait le tableau

Cette base de données a été créée en 2001 et est remise à jour sporadiquement (www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm). La dernière mise à jour date de juillet 2010. Bien que quelque peu arbitraire, elle constitue un outil important dans le suivi des différentes études caractérisant de nouveaux TAA.

1.3.2 Classification des antigènes tumoraux

On retrouve 2 grandes familles de TAA : les antigènes uniques et les antigènes partagés. Les antigènes uniques sont propres à un néoplasme en particulier. Ces antigènes constituent une signature tumorale qui n'est souvent pas partagée chez une deuxième tumeur induite chez un même animal. Les antigènes uniques sont principalement le résultat de mutations somatiques touchant différentes protéines exprimées par les cellules tumorales. La deuxième famille de TAA est celle des antigènes partagés. Ces antigènes sont des protéines dont l'expression est partagée au niveau de certains tissus normaux et cancéreux. L'expression de ces protéines peut être observée durant le développement ou encore à l'âge adulte. La distinction entre ces 2 familles permet de mieux comprendre la classification subséquente des TAA en 4 catégories, soit les antigènes mutés, les antigènes de différenciation, les antigènes de cellules germinales et les antigènes surexprimés (113).

Antigènes mutés

Comme il a été mentionné précédemment, cette catégorie constitue la famille des antigènes uniques. Cette catégorie représente des cibles cruciales dans l'exploitation de la réponse anti-tumorale, car les mutations subies par les protéines exprimées au sein des cellules cancéreuses contribuent, pour la plupart, au développement et à la progression tumorale (113). Ces antigènes sont très spécifiques et partagés par un nombre très restreint de patients. Bien que certains de ces antigènes aient été mis en évidence pour des cancers comme celui du poumon et colorectal, une majorité d'entre eux ont été identifiés dans le mélanome (112). La cycline dépendante 4 kinase ainsi que la β -catenin sont des exemples de protéines dont les mutations observées dans les néoplasmes donnent lieu à des antigènes uniques (114, 115).

Antigènes de différenciation

Cette catégorie est la première de 3 permettant de classer les antigènes partagés. Les antigènes de différenciation sont habituellement exprimés dans le tissu normal duquel origine la tumeur. Ces protéines sont pour la plupart exprimées plus faiblement dans les tissus normaux. Elles peuvent cependant être présentées par les CMH-I des cellules normales au même titre que les cellules tumorales. Les lymphocytes T, reconnaissant spécifiquement ces antigènes, affichent donc une certaine tolérance face à ces derniers, lorsqu'ils sont présentés par les CHM-I des cellules tumorales. Cette tolérance peut cependant être brisée et causer une réaction des lymphocytes T dirigée non seulement contre la tumeur exprimant ce TAA, mais également contre le tissu normal (116). Cette réaction dite "auto-immune " est entre autre observée dans le mélanome lorsque le système immunitaire est stimulé pour réagir contre des antigènes partagés par le néoplasme et les mélanocytes. À l'occasion, cette réaction donne lieu au vitiligo qui se caractérise par la perte de pigmentation fourni par la mélanine, retrouvée entre autre dans la peau, les cheveux et la rétine (117). Les TAA les plus connus de cette catégorie appartiennent d'ailleurs au mélanome. Il s'agit des protéines gp100 et Melan-A (MART-1), toutes 2 impliquées dans la biosynthèse de la mélanine dans les tissus normaux et cancéreux (118). On retrouve aussi le *carcinoembryonic antigen* (CEA) dans cette catégorie. Cet antigène est surtout attitré aux cancers intestinaux et est également exprimé au niveau de l'intestin normal (119). Il peut cependant être retrouvé chez des tumeurs endothéliales d'origine autre comme le sein (120).

Antigènes de cellules germinales

C'est dans cette catégorie que l'on retrouve MAGE-1, le premier TAA identifié. Ces antigènes proviennent de la réactivation de gènes jadis fonctionnels dans les cellules germinales mais silencieux dans les tissus sains matures, à l'exception des spermatozoïdes. Comme ces derniers n'expriment pas de CMH-I et -II, une réaction du système immunitaire

dirigée contre des antigènes de cellules germinales génère plus rarement une réponse auto-immune (121). De nombreux antigènes ont été caractérisés dans cette catégorie, mais leur fonction dans la progression tumorale reste souvent nébuleuse (116). Les antigènes de cellules germinales sont exprimés par des tumeurs d'origines variées. Parmi les antigènes les plus connus de cette catégorie, on retrouve la protéine NY-ESO-1 (122) un des antigènes les plus immunogéniques de cette catégorie. Il est retrouvé dans de nombreux cancers dont environ 20% des cancers du poumon, 10 à 30% des cancers du sein et plus du quart des mélanomes et cancers de la prostate (123).

Antigènes surexprimés

Cette catégorie est la troisième et dernière catégorie constituant le classement des antigènes partagés. La différence majeure entre ces TAA et ceux appartenant à la catégorie d'antigènes de différenciation est que l'expression des antigènes surexprimés n'est pas restreinte au niveau du tissu normal, d'où origine la tumeur, mais est également exprimé dans d'autres tissus sains (124). L'expression dans des tissus normaux limite la possibilité de prédire adéquatement le niveau de sécurité impliqué dans une réponse du système immunitaire dirigée contre les antigènes de cette catégorie; des risques d'effets secondaires pourraient survenir (réaction auto-immune dirigée contre des tissus potentiellement critiques pour la survie). Une attention particulière est donc accordée au niveau d'expression de ces antigènes dans les tissus normaux pour les TAA de cette catégorie. Même si seulement une faible expression dans les tissus sains est tolérée, il est difficile de prédire la limite basale de tolérance des lymphocytes T. Les antigènes les plus connus de cette catégorie sont sans doute Her-2/*neu*, antigène connu dans le cancer du sein, Mucin 1 (MUC1) et p53 (112).

Pour conclure, l'étude des différentes catégories d'antigènes associés aux cellules tumorales nous permet d'apprécier la variété d'antigènes identifiés à ce jour. À première vue, il ne semble plus y avoir de besoin pour l'identification et la caractérisation de nouveaux TAA et de nouveaux épitopes. Toutefois, un bon nombre de TAA identifiés sont pour le mélanome et ne sont pas nécessairement transposables aux autres cancers. De plus, peu d'antigènes sont présents chez plus de 40% des tumeurs affectant un même organe, la majorité se situant autour de 20%. Donc, les possibilités de traitement faisant appel à plusieurs antigènes pour différents patients, atteints d'un même cancer (autre que le mélanome), sont restreintes. La disponibilité de peptides pouvant être présentés par CMH-I et -II pour un même TAA est également limitée. Une dizaine de peptides pouvant être présentés par CMH-I et -II ont été identifiés seulement pour certains TAA comme par exemple le CEA, NY-ESO-1 et MAGE (112). L'activation de différents clones de TCD8⁺ et T CD4⁺ constitue un point critique pour la réactivité du système immunitaire. Cependant, lorsque ces clones sont tous dirigés contre le même TAA, il peut se produire une évaison des cellules tumorales n'exprimant pas cet antigène (immunoédition, point 1.2.2). Il devient évident que l'utilisation des TAA dans le traitement contre le cancer nécessite l'identification et la caractérisation d'une grande variété de TAA et d'épitopes pouvant être présentés par CMH-I et -II afin de contrer l'immunosélection des cellules tumorales et rejoindre les néoplasmes de différentes provenances.

1.4 L'immunothérapie des cancers non-hématologiques

Les traitements utilisés contre le cancer dont il a été question jusqu'à présent sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ces traitements sont couramment déployés dans la plupart des centres médicaux au Canada, mais ne sont pas applicables à tous les cancers et surtout à tous les stades. Comme il a été présenté précédemment, le cancer est encore responsable d'un grand nombre de décès. Il est donc justifié et même nécessaire de développer de nouvelles approches pouvant être utilisées, seules ou en combinaison, avec les différentes interventions déjà disponibles. Les traitements dits "biologiques" représentent une nouvelle addition aux possibilités de traitements contre le cancer. Ce type de traitement comprend entre autre les traitements exploitant le système immunitaire du patient afin de provoquer l'éradication de la tumeur, mieux connus sous le nom d'immunothérapie du cancer.

Bien que le concept d'immunothérapie du cancer semble relativement nouveau, la première expérimentation de ce type de traitement remonte au début du 20^{ième} siècle. Le Dr William Coley, un chirurgien de New York, fut le premier à utiliser le système immunitaire des patients dans le traitement contre leur néoplasme. L'idée d'impliquer le système immunitaire dans une thérapie anti-tumorale lui est venue suite à l'histoire de cas d'un patient dont l'infection d'une plaie causée suite à l'ablation d'une tumeur récurrente à la joue, avait empêchée le retour du cancer. Coley suspectait un lien direct entre l'infection de la plaie et la disparition complète de la tumeur. Après un certain nombre d'expérimentations, il développa un vaccin à base des bactéries *S pyogenes* et *Serretia marcescens* (tuées), connu sous le nom de *Coley's toxins* (125). Ce vaccin permettait de causer de l'inflammation sans développer d'infection bactérienne. Coley a administré ce vaccin à plus d'une centaine de patients et obtenu un taux de réponse dépassant les 10% (126). Le vaccin de Coley n'est pas devenu un traitement standard, mais est l'instigateur d'une des premières immunothérapies anti-tumorales développées dans les années 70 et encore utilisées aujourd'hui : l'injection du bacille Camette Guérin (BCG). Cette

mycobactérie est utilisée dans le traitement des carcinomes de la vessie en stades précoces. Cette immunothérapie a remplacé l'ablation de la vessie comme traitement pour ce type de cancer et permet de prévenir la récurrence (40, 127).

Il n'y a pas que les composantes bactériennes qui peuvent être exploitées dans l'immunothérapie du cancer. Pour mieux comprendre les différentes possibilités qu'offre l'immunothérapie anti-tumorale, on divise cette dernière en trois catégories. Ces 3 catégories sont établies selon la composante du système immunitaire qui y est interpellée. Ainsi on retrouve l'immunothérapie à base de cytokines, l'immunothérapie avec des anticorps bloquants et l'immunothérapie cellulaire. Bien que les 3 types seront abordés et décrits, un intérêt particulier sera porté à l'immunothérapie cellulaire puisque cette dernière est essentiellement visée par cette étude.

1.4.1 L'immunothérapie par les cytokines

La réponse immunitaire est un processus complexe qui se déroule suite à la communication entre les différentes cellules immunitaires et leur environnement. Les interactions complexes qui régissent cette réponse sont réalisées, entre autre, par un groupe de protéines appelées cytokines. Les cytokines sont des protéines de communication de faible poids moléculaire et des glycoprotéines sécrétées principalement par les cellules immunitaires mais pouvant également être sécrétées par d'autres types de cellules en réponse à un stimulus. Les cytokines sont essentielles au développement de la réponse immunitaire cellulaire et humorale. Elles sont aussi nécessaires à l'induction de la réponse inflammatoire, à l'hématopoïèse, au contrôle de la prolifération cellulaire et la différenciation ainsi qu'à la guérison tissulaire. Il existe plus de 200 cytokines connues. La spécificité de la réponse par cytokines est assurée, entre autre, par la présence de récepteurs spécifiques à ces cytokines, exprimés par les cellules cibles. La sécrétion des différentes cytokines se fait également suite à des contacts bien précis, comme par exemple, suivant l'interaction TCR-peptide-CMH et autres molécules de co-stimulation. La concentration de

cytokines est habituellement élevée localement et diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne du point de production. Finalement, la demi-vie des cytokines se retrouvant dans la circulation sanguine est relativement courte limitant ainsi la durée et la portée d'action (19).

Comme il a été mentionné précédemment, certaines cytokines dont l'IFN- γ ont démontré un rôle important dans la protection contre le développement de tumeurs. Cette observation a été réalisée, entre autre, chez les souris mutées dans l'expression du gène de l'IFN- γ , entraînant l'absence de production de la cytokine (25). L'absence d'IFN- γ stimule la croissance tumorale par différents mécanismes dont l'atténuation de la prolifération des cellules immunitaires tels les lymphocytes et l'apoptose de ces derniers, la stimulation de l'angiogénèse et la perte ou réduction de présentation de TAA par CMH-I (40). La capacité de certaines cytokines à moduler la tumeur et son environnement explique l'intérêt de l'utilisation clinique de certaines d'entre elles en immunothérapie du cancer.

Traitement systémique

L'utilisation de cytokines en traitement systémique avait pour objectif de reproduire l'effet anti-tumoral observé avec le vaccin de Coley tout en évitant les risques de choc septique. Ainsi, plusieurs cytokines ont été testées en essai clinique dont l'IFN- γ , l'IFN- α , l'IL-2, IL-12, TNF- α et le GM-CSF (40). L'IL-2 a été la première cytokine caractérisée dans le modèle animal et humain pour une utilisation systémique. Dr. Steven Rosenberg et ses collègues ont utilisé l'IL-2 comme agent de première ligne pour le traitement de centaines de patients atteints d'un mélanome ou d'un cancer du rein métastatique n'ayant répondu à aucun autre traitement. Suite à ce traitement, ils ont observé une réponse anti-tumorale chez environ 20% de ces patients avec 3 à 5% de patients présentant une régression complète et durable de la tumeur (128, 129). Bien que cette cytokine contribue à l'activation des lymphocytes T effecteurs et des NK, elle contribue également à celle des

Treg qui sont extrêmement sensibles à l'action de l'IL-2 (130, 131). Cette activation des Treg peut contribuer à expliquer les résultats quelques peu modestes obtenus suite à un traitement systémique à l'IL-2 (131). Les traitements avec des doses élevées d'IL-2 sont également la cause d'un effet secondaire très sérieux nommé "Syndrome de perméabilité vasculaire", par la libération massive d'IL-1, d'IFN- γ et de facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α); des cytokines agissant sur la perméabilité des vaisseaux sanguins. Cette augmentation de perméabilité engendre de graves conséquences cependant réversibles comme l'œdème pulmonaire (132).

Suite aux multiples démonstrations de l'action anti-tumorale de l'IFN- γ réalisées dans le modèle murin, les attentes quand à l'utilisation de cette cytokine comme traitement systémique était élevée. Malheureusement, les essais cliniques réalisés avec le mélanome, le cancer du poumon et celui du rein n'ont montré aucun bénéfice (133). De meilleurs résultats ont été obtenus avec l'utilisation de l'IFN- α , un interféron de type 1. Les traitements utilisant des doses élevées d'IFN- α dans le mélanome de stade avancé ont montré une augmentation dans la survie globale des patients et dans la persistance sans maladie (133). Les taux de régression tumorale n'ont cependant pas dépassé ceux obtenus avec l'IL-2, soit autour de 16%. La combinaison des 2 cytokines en traitement n'a pas non plus augmentée le taux de régression tumorale (134). L'IFN- α possède une longue histoire d'utilisation clinique dans plusieurs cancers et est encore aujourd'hui très utilisé dans le mélanome métastatique et est reconnu non seulement pour son effet adjuvant, mais également cytostatique (135). L'IL-12, IL-4, IL-6 ont aussi été évaluées comme agent de première ligne sans toutefois obtenir de résultats autre que négligeables (136).

Le traitement systémique à base de cytokines de patients atteints de cancer avec stades avancés a donné des résultats modestes comme traitement de première ligne. L'action anti-tumorale de ces cytokines n'était pourtant pas négligeable dans les différents modèles murins testés. Cette divergence dans les résultats obtenus chez la souris et que l'on tente de transposer à l'humain est très fréquente en immunothérapie du cancer. La tangente est maintenant à l'exploitation de ces cytokines comme l'IL-2 et l'IFN- α en tant

qu'adjuvants afin d'augmenter la réponse anti-tumorale obtenue avec un traitement de première ligne. Cette utilisation de cytokines en traitement de deuxième ligne sera soulignée lorsque nous aborderons les autres types d'immunothérapie du cancer.

1.4.2 L'immunothérapie par les anticorps bloquants

Le deuxième type d'immunothérapie du cancer que l'on retrouve est celui faisant appel à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les anticorps monoclonaux sont appelés ainsi parce qu'ils sont dirigés contre un même épitope, puisqu'ils tirent leur origine d'un même clone. Il s'agit d'immunoglobulines chimériques dont les composantes sont humaines et murines (19). Il existe une gamme appréciable d'anticorps disponibles dans le traitement des lymphomes et des leucémies (137). Cependant, comme cette étude se concentre sur l'immunothérapie des cancers solides, plus particulièrement des cancers communs, ces anticorps ne seront pas discutés davantage. Nous nous attarderons donc principalement sur les anticorps utilisés dans le traitement des tumeurs solides.

Anticorps monoclonaux dirigés contre des TAA

Les TAA sont, comme il a été expliqué précédemment, des protéines exprimées par les cellules tumorales et absentes des tissus normaux dérivés d'organes importants. L'intérêt des TAA a été discuté seulement dans l'optique d'une réponse effectrice cellulaire impliquant les $T CD8^+$ et les $T CD4^+$. L'immunothérapie par anticorps monoclonaux profite également de la spécificité qu'offrent les TAA dans le traitement contre le cancer. Ainsi, l'utilisation d'anticorps dirigés contre des TAA (fréquemment des récepteurs), permet d'inhiber le signallement engendré par la molécule ciblée. L'anticorps lié à l'épitope se trouvant à la surface de la cellule tumorale peut également marquer cette cellule comme une cible pour la lyse cellulaire, suite à la reconnaissance de la partie non liée de l'anticorps

par les récepteurs Fc des cellules NK (138) Les APC possèdent également des récepteurs Fc leur permettant de phagocyter les particules tumorales liées aux anticorps. Une fois internalisé, les particules sont apprêtées en peptides pour être présentés non seulement par CMH-II, mais également par présentation croisée par CMH-I pour activer les T CD8⁺ (139).

Les anticorps monoclonaux dirigés contre des TAA les plus connus sont le cetuximab, dirigé contre le récepteur de facteur de croissance épidermique (EGFr ou Her1); le bevacizumab, dirigé contre le récepteur du VEGF et le transtuzumab, dirigé contre Her-2/*neu*. Ces trois anticorps ont été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour l'administration chez l'humain (140). Ils ont tous été utilisés comme traitement unique, mais se sont montrés beaucoup plus efficaces lorsque combinés à d'autres traitements comme la chimio ou la radiothérapie (138). Le transtuzumab est utilisé dans les cancers du sein dont les cellules sont positives pour l'expression d'Her-2/*neu*. Le traitement avec cet anticorps a montré des résultats positifs dans l'élévation de la survie globale des patientes et la survie sans maladie (141). L'utilisation de cet anticorps en combinaison avec une vaccination peptidique d'Her-2/*neu* (discuté plus tard) a démontré une amélioration dans l'activité clinique du transtuzumab en provoquant une augmentation de la réponse immunitaire dirigée contre Her-2/*neu* (142). Pour leur part, les anticorps dirigés contre les récepteurs de l'EGF et du VEGF ont été tous deux utilisés dans le traitement contre les cancers colorectaux et respectivement, dans les cancers buccaux et du poumon. Ces 2 anticorps bloquent la prolifération des cellules tumorales, mais empêchent également l'angiogénèse. Leur utilisation a montré une augmentation dans la survie globale des patients et la survie sans maladie (143, 144).

Même si ces anticorps monoclonaux ciblent des molécules également exprimées dans les tissus normaux, la toxicité observée est souvent de moindre importance (138). Comme Her-2/*neu* est important dans le développement et la fonction cardiaque, il peut arriver qu'un traitement avec le transtuzumab cause une toxicité au niveau des cellules cardiaques. Cette toxicité serait attribuable à l'action même de l'anticorps sur les cellules,

plutôt qu'à la réaction immunitaire provoquée par la suite. Dans la plupart des cas, les dommages sont réversibles (145).

Anticorps monoclonaux dirigés contre des inhibiteurs de l'activation des lymphocytes T

Le système immunitaire possède différents mécanismes lui permettant de mettre fin à une réponse immune lorsque celle-ci n'est plus nécessaire, un processus souvent référé comme contraction. Ces mécanismes lui confèrent également une certaine tolérance afin d'éviter les réactions auto-immunes ou les réactions inflammatoires chroniques. Certains de ces mécanismes peuvent être attribuables à l'action de certaines cellules comme les Treg (discuté précédemment). D'autres sont intrinsèques à la cellule activée et se regroupent sous l'appellation de récepteurs d'inhibitions. Ces mécanismes, vus comme un "frein" à la réponse immunitaire, deviennent des cibles de choix dans une perspective d'immunothérapie contre le cancer. La super famille des immunoglobulines CD28/B7 est un exemple de récepteurs inhibiteurs exprimés chez les lymphocytes et pouvant être ciblés par anticorps monoclonaux (146). L'anticorps monoclonal dirigé contre le *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) est le plus étudié. Lorsqu'un lymphocyte T est activé par la rencontre du TCR avec un antigène contre lequel il est spécifique, il y a également interaction avec des molécules de co-stimulation présentes à la surface de l'APC. Les APC expriment la molécule B7 (CD80 et CD86) qui interagit avec le CD28 exprimé par le lymphocyte T, ce qui augmente l'activation de ce dernier. Comme mécanisme de contrebalance, les lymphocytes T activés expriment également le CTLA-4 qui possède une affinité pour la molécule B7 supérieure à celle du CD28. Ainsi, l'expression du CTLA-4, suite à l'activation du lymphocyte et son interaction avec B7, provoque une inhibition des lymphocytes T afin de permettre un retour à l'homéostasie après la réponse immunitaire (19). L'ipilimumab et le tremelimumab sont des anticorps monoclonaux dirigés contre le CTLA-4 qui empêchent sa liaison avec la molécule B7

(147). Les anticorps dirigés contre CTLA-4 ont été utilisés dans le traitement de mélanomes métastatiques avec des résultats très encourageants ainsi que dans le cancer de la prostate hormono-réfractaire et le cancer du rein. Ces traitements comparaient l'action de l'anticorps seul ou encore combiné à la chimiothérapie ou une vaccination peptidique ou utilisé en adjuvant. Dans bien des cas, une réponse favorable clinique corrélait cependant avec une réponse auto-immunitaire se contrôlant la plupart du temps par un traitement aux stéroïdes (148-151).

Suite à la récente approbation de l'ipilimumab par la FDA, les perspectives semblent favorables pour l'immunothérapie utilisant les anticorps monoclonaux (152). Cependant, comme pour l'immunothérapie à base de cytokines, l'intérêt semble se développer vers l'utilisation de ces anticorps en combinaison avec d'autres thérapies, immunologiques et non immunologiques.

1.4.3 Immunothérapie à médiation cellulaire

1.4.3.1 Les Vaccins

L'identification d'antigènes spécifiquement exprimés par les cellules tumorales ou partagés avec des tissus sains de moindre importance a permis le développement de différents types de vaccination pour l'immunothérapie du cancer. Le but général de la vaccination anti-tumorale est la guérison plutôt que la prévention, ce qui diffère de la vaccination anti-virale. Lorsqu'un patient reçoit un vaccin dans le cadre d'un traitement par immunothérapie, celui-ci est déjà atteint de la maladie et souvent dans un stade très avancé. Afin qu'un vaccin anti-tumoral soit efficace, il est primordial que l'antigène ciblé puisse être présenté par les APC afin d'engendrer l'activation des lymphocytes T. Il est également essentiel que ces lymphocytes activés puissent par la suite, développer une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales. La persistance de la réponse anti-tumorale (mémoire) au-delà de la maladie est également souhaitable.

Les vaccins anti-tumoraux peuvent être classés en 4 grandes catégories. On retrouve notamment les vaccins à base de peptides (incluant les protéines), les vaccins à base de cellules tumorales (incluant les lysats), les vaccins à base de cellules dendritiques et les vaccins par transfert de gènes (incluant l'ADN et les vecteurs viraux) (137). Étant donné que la présente étude s'intéresse principalement à l'immunothérapie à médiation cellulaire, c'est principalement autour de ce concept que se rattachera, encore une fois, la littérature présentée subséquentement.

1.4.3.1.1 Vaccins à base de peptides

Lors de la caractérisation des TAA, il est souvent pertinent d'identifier des peptides dérivés pouvant être reconnus par les T CD8⁺ et les T CD4⁺ ainsi que l'identification de l'haplotype du HLA (de classe I ou II) pouvant présenter ces peptides. Cette caractérisation a mené à l'identification de différentes molécules pouvant être utilisées comme vaccins peptidiques. Ces vaccins consistent en l'injection de peptides correspondant aux épitopes pouvant lier les CMH à la surface des cellules tumorales ou être internalisés par les APC et ainsi potentiellement activer les T CD8⁺ et les T CD4⁺ afin d'induire une réponse contre la tumeur.

Les peptides présentés par CMH-I

Plusieurs de ces vaccins peptidiques ont été réalisés dans le mélanome métastatique. À la base, ils étaient composés d'un ou deux peptides pouvant être présentés par CMH-I et administrés avec la Montanide ISA 51 et/ou des cytokines comme l'IL-2, l'IL-12 et le GM-CSF (124). Ces cytokines servaient ici non pas de traitement de première ligne, mais plutôt d'adjuvant afin d'augmenter la réponse immunitaire contre l'antigène, en contribuant à l'activation des cellules immunitaires. La Montanide (*Freund's incomplete adjuvant*), un

mélange composé d'eau et d'huile, servait aussi d'adjuvant en enveloppant l'antigène de gouttelettes d'huile pour prolonger sa persistance au site d'injection (19, 153).

L'enthousiasme autour de ces essais cliniques a été important d'une part, parce que ces vaccins ne causaient pratiquement pas d'effets secondaires et n'engendraient pas de coûts élevés de production. D'autre part, plusieurs ont vu des évidences cliniques du succès de ces vaccins après avoir observé une augmentation de lymphocytes T spécifiques aux TAA dans le sang circulant, une augmentation de l'infiltration lymphocytaire au niveau de la tumeur et des évidences de nécrose. Cependant, lorsque les bénéfices ont été évalués selon les critères de RECIST (*Response Evaluation Criteria in Solid Tumors*), les résultats se sont avérés décevants. Le RECIST implique une diminution de 30% de la taille de la tumeur, calculée à partir de son diamètre le plus long. Cependant, selon Dr. Steven A. Rosenberg, une diminution d'au moins 50% témoigne vraiment de l'efficacité du traitement et est considéré comme un critère standard (154). Suite à ce retour sur l'analyse des résultats selon ces critères, il s'est avéré qu'une réponse clinique avait été observée chez seulement 10% des patients traités avec les vaccins peptidiques. Toutefois, lorsque certains bénéfices comme la stabilité de la maladie ont été ajoutés à l'équation, le pourcentage de patients ayant répondu a grimpé à 30%, ce qui a motivé la poursuite des recherches (124).

Dernièrement, le Dr. D. Schwartzentruber a rapporté les résultats d'une étude clinique de phase III effectuée dans le mélanome avec la vaccination d'un peptide de CMH-I de la protéine gp100 (g209-217, modifié en position 2 avec l'ajout d'une méthionine afin d'augmenter l'affinité et la stabilité) administré avec des doses élevées d'IL-2 en comparaison avec seulement l'IL-2. Pour la première fois, un bénéfice réel a été observé chez les patients vaccinés avec le peptide, soit 22,1% de réponse clinique comparativement à 9,7% avec l'IL-2 seulement (155).

Plusieurs interrogations se sont posées face à la dichotomie observée dans le développement d'une réponse immunitaire suite à la vaccination et la régression tumorale. L'utilisation de un ou 2 peptides peut mener à la destruction des cellules exprimant ces

TAA et ainsi, au relâchement et ciblage de d'autres TAA qui n'étaient pas directement visés par le vaccin (défini comme *antigen spreading*) (156, 157). Comme discuté précédemment, ces TAA peuvent être récupérés par les APC qui les présenteront aux lymphocytes T pour générer une réponse anti-tumorale contre des TAA non impliqués dans la vaccination. Ce scénario représente le déroulement souhaité, mais il peut arriver que la vaccination avec un peptide crée une réponse mono-spécifique qui pourrait amener l'immunosélection des cellules tumorales n'exprimant pas ce TAA ou encore une diminution de la présentation par CHM-I de ce peptide et ainsi conduire à l'évasion tumorale (158). Pour tenter d'éviter cette situation, certains ont envisagé la vaccination avec plusieurs peptides.

Des essais cliniques de vaccination avec plusieurs peptides ont été réalisés dans le mélanome, le cancer du poumon, de la prostate, de l'ovaire et du colon (124). Dans certaines études effectuées chez le mélanome, plus de 12 peptides provenant de 5 différents TAA (tyrosinase, gp100, MAGE-A, MAGE-10 et NY-ESO-1) ont été évalués en clinique. Malgré le fait que certains peptides peuvent être mieux présentés et reconnus par les lymphocytes T que d'autres et que la fréquence de lymphocytes circulant spécifiques aux peptides puisse varier, aucune de ces études n'a rapporté le développement de réponses favorisant un peptide plus qu'un autre. Une association entre la réponse immunitaire et la réponse clinique a aussi été rapportée (159). Encore une fois, bon nombre des essais cliniques concernant les vaccins peptidiques se sont déroulés dans le mélanome métastatique. Il s'agit également du cancer pour lequel la plus grande variété de TAA a été testée dans un même vaccin.

Les longs peptides

Une autre approche dans la vaccination peptidique consiste à utiliser de longs peptides synthétiques. Ces peptides pouvant aller jusqu'à 30 a.a. contiennent plusieurs épitopes d'un même TAA pouvant être présentés par divers CMH-I. Ce type de peptide doit

être apprêté par les APC afin d'être sectionné et présenté par CMH-I aux T CD8⁺ et même dans certains cas, aux T CD4⁺, si des peptides de classe II peuvent s'en dégager. Les longs peptides synthétiques se sont avérés être très immunogènes chez les patients, mais les premiers essais réalisés dans le cancer du col de l'utérus, avec des peptides provenant des protéines précoces E6 ou E7 du virus du papillome humain, n'ont pas montré d'association clinique (160).

À ce jour, aucun essai clinique de vaccination n'a été réalisé avec l'administration d'un vaccin peptidique combinant des peptides provenant de plusieurs TAA incluant des épitopes pouvant être présentés par CMH-I ainsi que d'autres pouvant être présentés par CMH-II. En ciblant plusieurs antigènes de cette façon, il serait possible de prévenir l'immunosélection. De plus, l'ajout de quelques épitopes de CMH-II permettrait de profiter des avantages de l'activation des T CD4⁺ lors d'une réponse anti-tumorale, soit l'aide à l'activation des T CD8⁺ et le développement de cellules mémoires.

1.4.3.1.2 Vaccins à base de cellules tumorales

La vaccination à base de cellules tumorales a été développée afin de palier à l'importante barrière se posant avec les vaccins peptidiques, soit la spécificité du HLA du patient. Les peptides utilisés pour la vaccination peptidique peuvent lier un type précis de CMH-I, souvent les plus communs retrouvés dans la population. Un patient possédant un type d'HLA plus rare est donc limité pour la thérapie utilisant les peptides définis. L'emploi des cellules tumorales en vaccination n'est pas restrictif quand au type de HLA du patient. La vaccination à base de cellules tumorales permet aussi de cibler une plus grande quantité de TAA, caractérisés ou non, permettant de générer des peptides pouvant stimuler les T CD8⁺ et les T CD4⁺, afin d'éviter l'immunosélection de certains variants tumoraux pouvant contribuer à l'évasion tumorale (161, 162). La vaccination peut se faire avec des cellules tumorales autologues ou allogéniques (19). L'utilisation des cellules autologues du patient représente un avantage important considérant que la tumeur peut

contenir des TAA uniques, qui comme discuté plus tôt (point 1.3.2), représentent une source d'antigènes très immunogéniques. D'autre part, la vaccination utilisant des cellules tumorales allogéniques est facilement transposable d'un individu à l'autre et s'exploite commercialement pratiquement au même titre que la vaccination peptidique. De plus, il peut être difficile d'obtenir des quantités suffisantes de cellules cancéreuses autologues, pour certains cancers métastatiques dont la lésion primaire n'est pas clairement définie ou a déjà été enlevée. Les cellules tumorales allogéniques partagent souvent quelques TAA communs avec la tumeur du patient (163). Parmi les exemples de lignées cellulaires utilisées pour ce type de vaccination, on retrouve les cellules MCF-7 dans le cancer du sein et les cellules LNCaP dans le cancer de la prostate (164, 165).

La première génération d'essais cliniques réalisés avec ce type de préparation dans le mélanome métastatique n'a pas révélé un fort potentiel immunogénique : très peu de bénéfices cliniques ont été observés. Ces premiers vaccins préparés à partir des cellules tumorales contenaient simplement des cellules autologues ou allogéniques irradiées (155). Plusieurs essais cliniques ont également été réalisés dans différents cancers dont le cancer du poumon, du sein, de la prostate, de l'ovaire et du foie. *Neller et al.* ont compilé les résultats de ces différents essais cliniques et les ont comparés avec des essais cliniques développés avec les vaccins peptidiques. Sur plus de 2000 patients, ils ont observé un taux de réponse de 8,1% suivant une vaccination utilisant les cellules tumorales comparativement à 3,6% pour les patients ayant reçu un vaccin peptidique. Ce qu'ils définissent par "réponse clinique" n'est cependant pas clairement établi et pose un problème quand à l'appréciation de ces résultats (166). Fait intéressant à souligner, *Neller et al.* n'ont pas observé de réponse immunologique supérieure lorsqu'ils ont comparé les essais avec des cellules autologues versus les cellules allogéniques. Cette observation témoigne du faible potentiel immunogénique des cellules tumorales autologues malgré la source importante d'antigènes uniques qu'elles représentent.

Les composantes et la préparation du vaccin à base de cellules tumorales

Les composantes du vaccin à base de cellules tumorales peuvent être préparées à partir de cellules tumorales entières ou à partir de vésicules de cellules tumorales. L'administration de ces vaccins peut être faite directement ou avec l'utilisation d'un support de présentation antigénique comme les DC (discuté au point 1.4.3.1.3). Les composantes vésiculaires utilisées en vaccination sont les exosomes produits par les cellules tumorales. Les exosomes sont des microvésicules provenant des voies d'endocytoses et pouvant être sécrétés par la majorité des cellules (163). Il a été démontré, entre autre dans le mélanome, que les exosomes de cellules tumorales contiennent des TAA comme gp100, MART-1 et tyrosinase (167).

Concernant l'utilisation de cellules tumorales entières, il est préférable d'utiliser des cellules tumorales mortes, car les cellules tumorales peuvent produire des molécules immunosuppressives tel l'IDO et le TGF- β pouvant rendre un vaccin préparé à base de cellules vivantes très peu immunogène. La préparation de cellules tumorales peut se faire de différentes façons. La méthode la plus utilisée dans les essais cliniques est la préparation de lysat tumoral par une succession d'étapes de congélation et de décongélation. Les cellules subissent alors une mort par nécrose, provoquant le relâchement du contenu cellulaire dont les protéines de choc thermique (HSP). Les HSP possèdent la capacité d'activer certaines APC dont les DC en se liant au récepteur *toll like-4* (TLR4). Cette activation a pour effet d'augmenter la capacité de présentation des APC (168). Des études effectuées dans un modèle murin de glioblastome ont montré qu'il était préférable d'ajouter un adjuvant ayant la capacité d'activer d'autres TLR (oligonucléotides CpG qui activent les TLR7 et 9 par exemple (169)), lorsque le lysat tumoral est administré sans le support de cellules présentatrices.

Une seconde approche utilisée pour tuer les cellules tumorales est l'irradiation aux rayons ultraviolets. Cette approche engendre la mort des cellules tumorales par apoptose. Pendant l'apoptose, l'asymétrie de la membrane cytoplasmique est perdue et on assiste à

une rotation intérieure/extérieure de différentes molécules transmembranaires dont les phosphatidylsérines qui se retrouvent exposées à la surface. Les DC possèdent des récepteurs reconnaissant spécifiquement les phosphatidylsérines et responsables de l'engouffrement des corps apoptotiques par ces dernières (170). Les différents TAA contenus dans les corps apoptotiques pourront ensuite être présentés par CMH-II, mais également par CMH-I suite à une présentation croisée (Figure 7) (45, 49, 171).

Afin de potentialiser l'action des vaccins de cellules tumorales apoptotiques, certains groupes ont modifié ces cellules en leur conférant le pouvoir de sécréter du GM-CSF grâce à un vecteur d'adénovirus créant ainsi le vaccin GVAX. Ainsi, comme preuve de principe, un mélanome murin non-immunogène, le B16, exprimant le GM-CSF et irradié a engendré une réponse anti-tumorale protectrice chez la souris affectée d'un mélanome (172). Cette approche a été appliquée chez l'humain, dans le mélanome, avec l'utilisation de cellules tumorales autologues, mais également dans le cancer de la prostate avec des cellules allogéniques, soit les lignées cellulaires PC-3 et LNCaP. La transduction de ces lignées irradiées avec le GM-CSF amène une importante quantité de GM-CSF sécrété au site de l'injection ainsi que le déclenchement d'une réaction inflammatoire augmentant l'activation des DC ainsi que la présentation des TAA par ces dernières. Une activation des TCD8⁺ et des T CD4⁺ est alors observée dans les ganglions lymphatiques suite au contact avec les DC. Ce même effet n'a pas été observé suite à l'administration des 2 lignées tumorales et du GM-CSF sous forme protéique (173). Malheureusement, les 2 essais cliniques en phase III dans le cancer de la prostate avec le GVAX n'ont pas montré de bénéfices quand à la survie des patients (174).

En conclusion, étant donné l'effet immunosuppresseur que peut engendrer un vaccin à base de cellules tumorales, il serait probablement pertinent d'administrer ce vaccin en addition avec des anticorps comme l'anti-CTLA4 ou encore un anti-VEGF enfin de contrer cet effet négatif sur la réponse anti-tumorale (175).

1.4.3.1.3 Vaccins à base de cellules dendritiques (DC)

Les DC peuvent servir de vecteur de transport pour les vaccins peptidiques et cellulaires discutés ci-haut. Cette approche a été élaborée afin de tirer profit du rôle central des DC dans le contrôle de la réponse adaptative, et afin de contrer l'effet immunosuppresseur exercé sur les DC présentes dans l'environnement tumoral lors de l'administration de ces vaccins.

Généralités sur les DC

Les DC sont considérées comme les APC par excellence. Elles participent à l'induction de la réponse immunitaire en patrouillant à travers tout le corps pour capturer les pathogènes ou les cellules malignes. Une fois la capture exécutée, les DC subissent un processus de maturation qui se traduit par la perte des fonctions de phagocytose et l'augmentation d'expression des molécules de CMH-I et CMH-II et des molécules co-stimulatrices (B7) (19). Ce processus de maturation requiert également la participation de certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 (176). La maturation des DC est aussi amplifiée par l'interaction de motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) avec les TLR des DC. Ainsi, suite à cette activation, les DC migrent vers les organes lymphatiques secondaires, comme les ganglions, pour y présenter des peptides aux T CD8⁺ et aux T CD4⁺ (19). Certaines DC peuvent également générer l'expansion de Treg pour prévenir l'auto-immunité (177). Il existe 2 types de DC, les myéloïdes et les plasmacytoïdes. Les DC plasmacytoïdes sont impliquées dans l'immunité anti-virale et produisent de l'IFN de type I ce qui a pour effet de bloquer la dissémination virale. Les DC myéloïdes sont similaires aux DC générées à partir de culture de monocytes stimulés *in vitro* en présence d'IL-4 et de GM-CSF. Ce type de DC est celui impliqué dans l'initiation et la régulation de la réponse spécifique aux antigènes (178). Cette fonction est le principal attribut justifiant l'utilisation des DC myéloïdes dans les vaccins anti-tumoraux.

Les DC utilisées en vaccination

La préparation de DC pour vaccination nécessite une panoplie de décisions et d'étapes qui auront un impact majeur sur leur efficacité. L'injection de DC immatures n'est pas souhaitable puisque cette immaturité leur confère un rôle plus tolérogénique. Les DC injectées doivent donc avoir été préalablement maturées *in vitro*. Comme la maturation rend les DC non propices à la phagocytose, il est préférable d'induire la maturation des DC après les avoir exposées aux antigènes. Les DC activées expriment des molécules de co-stimulation comme les CD80 et CD86 (molécules B7) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-12, l'IL-15 et le TNF- α (179). La présence de ces cytokines est favorable à la réponse anti-tumorale induite, entre autre, par les lymphocytes. De plus, la voie d'injection est très importante. Des évidences suggèrent que l'administration de DC par voie intradermique et intra-lymphatique est plus efficace pour induire une réponse immunitaire; la voie veineuse procurant une moins bonne facilité d'accès aux ganglions (180, 181).

Bien que les vaccins à base de DC chargés d'antigènes ont la capacité de provoquer une expansion de lymphocytes T spécifiquement dirigés contre des TAA chez les patients immunisés, un bénéfice clinique a été démontré chez un nombre limité de patients (sur la base de la régression tumorale ou une augmentation de la survie sans maladie). Ces observations ont été réalisées indépendamment de la voie d'administration des DC (179). Les recherches tentent de déterminer les types précis de DC devant être utilisés pour ce genre de vaccin ainsi que les différentes combinaisons d'adjuvants. Le vaccin PROVENGE® (sipuleucel-T) développé par Dendreon Corporation et approuvé par la FDA, représente un des exemples les plus connus de ce type de vaccin. Le sipuleuce-TI est constitué d'une préparation d'APC contenant entre autre des DC autologues exposées *ex vivo* à la phosphatase acide prostatique (utilisée comme TAA) liée au GM-CSF (182). Un essai clinique de phase III réalisé dans le cancer de la prostate métastatique, a démontré un bénéfice sur la survie de 33% pour les patients ayant reçu le vaccin sipuleucel-T, comparativement à 15% pour les patients ayant reçu le placebo (183).

Certains essais tentent également d'exploiter l'utilisation d'ARN tumorale électroporée dans les DC pour ensuite les administrer aux patients. L'utilisation d'ARN permet une forte expression transgénique de différents TAA. Ce type d'essai a été effectué chez différents cancers dont le cancer du rein et le mélanome, mais l'instabilité de l'ARN présente un problème non négligeable et encore une fois, le sous-type "idéal" de DC à utiliser pour ce vaccin demeure un débat (184).

1.4.3.1.4 Vaccination par transfert de gènes

L'identification de gènes codants pour des TAA a permis l'élaboration de vaccins anti-tumoraux s'appuyant sur l'utilisation de plasmide et de vecteurs viraux recombinants. Ces vecteurs agissent comme transporteurs de TAA afin de faire exprimer ces derniers dans les cellules de l'hôte. Ainsi, suite à l'administration de ce type de vaccin, les DC se trouvant au site d'injection peuvent, suite à l'incorporation du vecteur, exprimer le TAA et présenter des peptides par CMH-I et -II pour activer les lymphocytes T. Ce type de traitement aussi appelé thérapie génique, consiste en la modification génétique d'une cellule à des fins thérapeutiques et permet de manipuler le système immunitaire de l'hôte afin de créer une réponse dirigée contre les cellules tumorales (185). Un des avantages de l'utilisation de ces vecteurs (plasmides ou viraux) est qu'il est possible de les manipuler, par l'addition ou la soustraction de certains motifs, pour faire en sorte que les TAA soient livrés spécifiquement dans un type de cellules ou évitent spécifiquement un autre type (186). La formulation de certains plasmides à ADN avec l'utilisation de particules peut améliorer la captation de ces derniers par les APC (187). Comme la vaccination peptidique, ce type de vaccination permet une production rapide et diversifiée, selon les TAA disponibles pour les cancers ciblés. Lorsqu'il est question de vaccins à base de vecteurs viraux, les coûts de production s'y rattachant augmentent de beaucoup.

Vaccins à ADN

Différentes techniques ont été développées pour introduire l'ADN et l'ARN correspondant à des TAA, afin de permettre l'expression de protéines recombinantes dans une variété de cellules *in vitro*. La transfection de cellules *in vivo* avec l'utilisation directe d'ADN ou d'ARN n'est cependant pas très efficace; fait attribuable principalement à la sensibilité de ces composantes à la dégradation. En 1990, *Wolf et al.* ont démontré qu'il était possible d'induire l'expression de gène dans les cellules musculaires *in vivo*, suite à l'injection directe d'un plasmide à ADN, chez la souris (188). La preuve fut ensuite établie que la protéine exprimée, suite à la transfection du gène contenu dans le plasmide, pouvait être présentée par CMH-I et induire une réponse protectrice de la part des T CD8⁺ spécifiques à la protéine encodée par le gène (189). Il a aussi été démontré que les plasmides provenant de bactéries avaient la capacité de stimuler la réponse immunitaire selon l'interaction avec les TLR9 présents sur les APC (190). Cette interaction vient conférer au plasmide un rôle d'adjuvant. Il est à noter que les plasmides utilisés pour ce type de vaccination peuvent aussi contenir des oligonucléotides pouvant interférer avec l'expression d'un gène (siRNA) (191).

La technique employée pour l'administration du vaccin à ADN viendra influencer le type cellulaire qui sera transfecté. Par exemple, un bombardement de l'épiderme avec les plasmides accolés à des micro-billes, connu sous l'appellation de *gene gun*, aura tendance à transfecter directement les cellules de Langerhans (DC retrouvées dans la peau). Ces DC migreront rapidement dans les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes T (192). Par contre, une injection musculaire résultera de la prise du plasmide par les cellules musculaires et l'activation des lymphocytes n'aura lieu que suite à la migration des DC au lieu d'injection, provoquée par l'induction d'inflammation (193, 194).

Les vaccins à ADN injectés chez l'humain ont jusqu'à maintenant démontré qu'ils étaient sécuritaires et bien tolérés. Cette observation fut d'ailleurs validée dès le premier essai clinique impliquant des patients atteints du virus de l'immunodéficience humaine

(VIH) (195). En ce qui concerne le traitement du cancer, les vaccins à ADN ont déjà été testés chez quelques types de cancers dont le mélanome, le cancer de la prostate et du col de l'utérus (196-199). La majorité de ces essais cliniques impliquaient l'administration des vaccins à ADN contenant un ou plusieurs peptides de TAA, en combinaison avec du GM-CSF et/ou de l'Il-2. Les essais dans le cancer de la prostate rapportent le développement d'une réponse immunitaire, cellulaire et humorale, dirigée contre le TAA inclus dans le vaccin, sans toutefois aborder de résultats sur la réponse clinique (196, 197). L'essai clinique de phase I mené tout récemment avec une cohorte de 9 patientes atteintes d'un cancer du col a rapporté une régression histologique complète chez 33% des patientes (199). Des essais cliniques sont présentement en cours dans les cancers du sein et du foie (185).

Vecteurs viraux

Les vecteurs viraux proviennent de virus possédant généralement un tropisme naturel pour les cellules dont l'infection fait partie intégrante de leur cycle de survie. Parmi les différents vecteurs viraux utilisés dans ce type de vaccination, on retrouve les adénovirus, les virus associés aux adénovirus, les poxvirus, les herpès virus et les rétrovirus (200). Quelques-uns de ces vecteurs seront discutés dans la présente section, dont les plus utilisés soit les adénovirus et le poxvirus.

Les adénovirus sont des virus à double brin d'ADN pouvant infecter plusieurs espèces. Ces virus peuvent infecter des cellules en processus de division ou non, mais n'ont pas la capacité d'intégrer le génome des cellules hôtes. Les adénovirus utilisés comme vecteurs sont incapables de se répliquer et peuvent induire une forte expression du transgène qu'ils transportent (201). Ils possèdent un pouvoir immunogène appréciable de par leur capacité à activer le système immunitaire inné et adaptatif, favoriser la maturation des DC immatures qu'ils infectent et créer une possibilité de présentation antigénique s'échelonnant sur une longue période, étant donné que les adénovirus n'induisent pas

l'apoptose des cellules qu'ils infectent (202). Dans le modèle animal comme celui du singe, la vaccination utilisant un vecteur adénoviral et un TAA (CEA) a démontré l'induction d'une forte réponse immunitaire des T CD8⁺ dirigés contre cet antigène (203). L'utilisation de ce vecteur a également démontré une réponse anti-tumorale efficace chez la souris, par l'éradication de métastases exécutée par les T CD8⁺ activés et une protection mémoire contre la réapparition du cancer (204). Le problème se posant avec l'utilisation des adénovirus, comme vecteur de vaccination chez l'humain, est qu'un fort pourcentage (40 à 60%) de la population a déjà été infecté naturellement par la souche de type 5; souche préconisée pour la vaccination. Une réponse mémoire contre le vecteur empêche ainsi l'infection adéquate des cellules visées par la vaccination (201). Afin de palier à la neutralisation du vecteur, les vecteurs adénoviraux provenant des primates ont été testés pour leur efficacité à briser la tolérance et induire une réponse anti-tumorale qui fut comparable à celle obtenue avec l'adénovirus de type 5 retrouvé chez l'humain (205). Cette trouvaille laisse donc présager une meilleure performance de ce type de vaccination chez l'humain.

En incluant les adénovirus, les poxvirus ont été les virus les plus étudiés comme vecteur. Suite à leur utilisation dans le vaccin contre la variole, ils ont fait leurs preuves quant à la sécurité de leur utilisation chez l'humain. Le virus de la vaccine est déjà utilisé comme vecteur dans la vaccination anti-virale (hépatite B, la rage et la rougeole). L'intérêt majeur de l'utilisation des poxvirus est leur capacité à y insérer des gènes de grandes tailles (200). Cependant, tout comme les adénovirus, une réponse à anticorps dirigée contre les vecteurs peut subvenir et interférer avec l'expression des TAA (206). Pour éviter la neutralisation du vecteur, il semble préférable d'utiliser une technique de vaccination appelée : *prime and boost* hétérologue. Ce principe consiste à faire plusieurs vaccinations contre le même TAA, en variant les formes sous lesquelles est fait l'administration (ex : protéine, peptide, vaccin ADN) (207, 208). Des études préliminaires effectuées avec le vecteur de la vaccine *Ankara* comportant le TAA 5T4, administré à des patients atteints d'un cancer du colon, ont confirmé l'aspect sécuritaire du vaccin ainsi que son

immunogénicité, se traduisant par le développement d'une réponse immunitaire chez 14 des 17 patients de la cohorte. La stabilisation de la maladie a été observée chez 5 de ces patients (209). Ces patients n'ont cependant pas reçu de *boost* hétérologue, mais les modèles murins tendent à démontrer que cette immunisation multiple et diversifiée, combinée avec l'activation des APC (ex : agonistes des TLR), serait plus efficace pour engendrer la régression tumorale (210).

Les vecteur rétroviraux, pour leur part, permettent une expression stable du gène qu'ils transportent, mais nécessitent une rupture de la membrane cytoplasmique afin que le transgène puisse pénétrer au noyau, ce qui signifie qu'ils ne peuvent qu'infecter les cellules en division (211). Afin de palier à cette restriction, les vecteurs lentivirus ont été développés. Ces virus étant plus complexes que les autres rétrovirus et possédant la capacité d'intégrer le transgène au génome de façon non-spécifique, occasionnent certaines craintes concernant la sécurité d'un traitement par administration directe *in vivo* (212). L'élaboration de vecteurs lentiviraux ne possédant pas la capacité de s'intégrer au génome, mais conservant leur habileté à modifier la cellule ciblée (ex : les DC) pour exprimer le transgène (ex : TAA) semble conférer une protection anti-tumorale lorsqu'administrés directement à des souris affectées d'une tumeur comportant l'antigène l'ovalbumine (considéré comme le TAA dans ce modèle) (213). Ces résultats obtenus dans le modèle murin laissent présager d'une utilisation chez l'humain en clinique.

Pour conclure avec les vaccins en général, la dichotomie entre le développement d'une réponse immunitaire anti-tumorale et l'observation d'une réponse clinique appréciable dans un bon nombre d'immunothérapie par vaccination signifie qu'il faut palier aux différents mécanismes d'évasion déployés par les cellules tumorales et augmenter la force de la réponse immunitaire. Encore une fois, la combinaison de différentes thérapies dont certaines activant le système immunitaire et d'autres freinant son inhibition, représentent de nouvelles stratégies à explorer.

1.4.3.2 Transfert adoptif de lymphocytes

Le transfert adoptif de cellules immunitaires permet de contrecarrer les mécanismes de tolérance, déployés par la tumeur, qui restreignent la prolifération des cellules immunes *in vivo* suite à une vaccination anti-tumorale. Le transfert adoptif de cellules immunitaires dans le cadre de l'immunothérapie du cancer peut être effectué à partir de cellules autologues ou allogéniques. Différentes cellules du système immunitaire, présentées dans le Tableau II, peuvent être utilisées dans ce processus (137). Pour les besoins de cette étude, nous ne développerons que le transfert adoptif se rapportant aux lymphocytes T autologues. Ainsi, il sera question du transfert adoptif de lymphocytes T cultivés *in vitro*, reconnaissant des antigènes viraux ou tumoraux, des lymphocytes T ayant infiltrés les tumeurs (TIL) et des lymphocytes T dont la spécificité antigénique a été génétiquement modifiée.

Stratégies	Méthodes de production	Défis
Infusion de lymphocytes allogéniques (DLI)	Isolement par leucaphérèse de leucocytes non-activés	Maladie du greffon contre l'hôte, leucopénie et infection
Cellules NK activées aux lymphokines (LAK)	Activation et prolifération <i>in vitro</i> de cellules NK avec de l'IL-2	Efficacité limitée
Infusion de cellules NK allogéniques	Isolement et purification de cellules NK de donneurs avec un haplotype identique aux receveurs, suivi de l'élimination des lymphocytes CD3 ⁺ et activation <i>in vitro</i> avec de l'IL-2 et de l'IL-15	Contamination de lymphocytes T alloréactifs dans le répertoire des NK
Lymphocytes ayant infiltrés les tumeurs (TIL)	Isolement de lymphocytes ayant infiltrés les tumeurs ou les ganglions lymphatiques et culture <i>in vitro</i> avec des cytokines.	<ul style="list-style-type: none"> - Difficultés d'obtention de TIL pour certains patients - Faible prolifération et anergie
Lymphocytes T CD8 ⁺ cytotoxiques spécifiques à un antigène défini	Réactivation et prolifération de T CD8 ⁺ dirigés contre des TAA ou des antigènes viraux	<ul style="list-style-type: none"> - Procédé complexe et laborieux - Prolifération <i>in vitro</i> insuffisante - Immunosélection des cellules tumorales
Transfert de gènes de TCR	Modification génétique de T CD8 ⁺ par l'insertion d'un TCR spécifique dirigé contre un TAA pour un type de CMH-I défini	<ul style="list-style-type: none"> - TCR hybrides - Reconnaissance du peptide et activation du T CD8⁺ restreintes à un type de CMH-I - Immunosélection des cellules tumorales
Récepteurs chimériques dirigés contre un antigène (CAR)	Modification génétique de T CD8 ⁺ par l'insertion d'un TCR chimérique constitué d'une partie d'un anticorps dirigé contre un TAA et du domaine de signalisation de la chaîne CD3	<ul style="list-style-type: none"> - Réponse à anticorps dirigés contre le CAR - Incapacité à proliférer et persister <i>in vivo</i>

Les différents types de cellules utilisées pour le transfert adoptif en immunothérapie du cancer. La méthode de préparation ainsi que les défis que posent ces différents types de transfert de cellules. Le tableau est adapté de celui présenté au chapitre 19 de *Immunotherapy of Cancer, Methods of Molecular Biology* en 2010.

Tableau II. Stratégies de transfert adoptif et leurs défis

(adapté de (137))

1.4.3.2.1 Transfert adoptif de lymphocytes T, cultivés *in vitro*, spécifiques à des antigènes viraux ou tumoraux

Antigènes viraux

Certaines tumeurs solides sont d'étiologie virale. C'est le cas du cancer nasopharyngeale associé au virus Epstein-Barr (EBV) (214). Il est possible, chez les patients atteints de ce cancer, de faire proliférer *in vitro* des T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre des antigènes faiblement immunogènes tel les protéines virales LMP1 et LMP2. *Straathof et al.* ont posé l'hypothèse que la génération *in vitro* de T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre ces antigènes, protégerait ces lymphocytes contre l'action immunosuppressive des cellules tumorales. Ces lymphocytes ainsi cultivés *in vitro* seraient capables d'une réponse anti-tumorale beaucoup plus forte que s'ils avaient proliféré *in vivo*, suite à une vaccination. Ce groupe a donc généré des lignées de lymphocytes T cytotoxiques qu'ils ont ensuite infusé à 10 patients atteints d'un cancer nasopharygeale. La réponse anti-tumorale qu'ils ont observée était polyclonale, car les lymphocytes utilisés pour le transfert adoptif n'étaient pas des clones (215). Deux patients, soit 20%, ont affiché une réponse complète et maintenue.

Antigènes tumoraux

Le même principe d'essai clinique a été réalisé dans le mélanome métastatique avec cette fois-ci des T CD8⁺ dirigés contre les TAA MART-1 et gp100. Dans cette étude, l'utilisation de clones de lymphocytes plutôt que des lignées a été préférée. La régression de certaines métastases a été observée pour 2 des 10 patients de la cohorte. L'apparition d'une nouvelle métastase a cependant été observée pour l'un d'eux. Une maladie stabilisée a été notée chez 4 patients, pour une durée médiane de 11 mois (216).

Pour l'instant, il a seulement été question de l'utilisation de T CD8⁺ dans ce type de transfert. En fait, peu d'études ont porté sur les T CD4⁺ dans le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques à des TAA. La grande diversité de produits alléliques des HLA de CMH-II dans la population est beaucoup plus complexe que celle de CMH-I. L'identification d'épitopes partagés, pouvant être utilisés pour une majorité de patients, est donc plus compliquée (217). La littérature fait état d'un essai clinique rapporté par *Hunder et al.* témoignant d'une réponse clinique complète développée chez un patient atteint d'un mélanome infusé avec des clones autologues de T CD4⁺ dirigés contre le TAA NY-ESO-1 (218). Malheureusement, les 8 autres patients de cet essai clinique n'ont pas répondu (217).

Le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques à des antigènes viraux ou TAA est particulièrement limitant dans son application à des cancers autres que le mélanome ou les cancers à étiologie virale. La fréquence de lymphocytes T spécifiques aux TAA autres que ceux retrouvés chez le mélanome étant faible, il est difficile de générer une quantité appréciable pour un transfert adoptif. La culture de lignées et spécialement de clones de T CD8⁺ est très exhaustive et difficilement envisageable comme traitement à grande échelle (137). Pour ces différentes raisons, les essais cliniques avec ce type de transfert adoptif ont été délaissés pour le bénéfice des 2 prochains types de transfert adoptif abordés, soit le transfert de TIL autologues et celui des lymphocytes génétiquement modifiés.

1.4.3.2.2 Transfert adoptif de lymphocytes T ayant infiltrés les tumeurs (TIL)

Au début des années 80, Dr. Mazumber et Dr. Rosenberg ont montré que suite à un transfert adoptif de splénocytes cultivés *in vitro* en présence d'IL-2, ils étaient capables de prévenir l'implantation de tumeur dans un modèle murin de mélanome (B16) et réduire les nodules tumoraux dans un modèle de traitement (219). Par la suite, en 1988, *Rosenberg et al.* publiaient la première démonstration, chez l'humain, de la régression d'un cancer suite au transfert adoptif de TIL et à l'administration de doses élevées d'IL-2. Ce transfert

adoptif avait été réalisé chez des patients atteints d'un mélanome avancé, réfractaire à tout autre traitement et une régression du cancer fut notée chez 11 des 20 patients de la cohorte (220).

Les TIL comportent une importante proportion de lymphocytes reconnaissant spécifiquement des antigènes TAA uniques ou partagés, comme il a été démontré dans le mélanome avec l'identification de plus de 50 TAA par l'utilisation des TIL (221). Entre 1987 et 1992, Dr. Rosenberg et ses collègues ont traité, par transfert adoptif de TIL autologues combiné à des doses élevées d'IL-2, un total de 86 patients atteints de mélanomes métastatiques. Certains de ces patients ont reçu de la cyclophosphamide en chimiothérapie (128). La cyclophosphamide est un agent alkylant qui lie l'ADN et inhibe sa réplication induisant ainsi la mort cellulaire (93). La cyclophosphamide a été abordée précédemment dans les Treg (point 1.2.2.3, L'évasion). Indépendamment du traitement à la cyclophosphamide, 34% des patients ont montré une régression tumorale objective (128). Pour ces essais cliniques, les TIL administrés n'étaient pas testés pour leur reconnaissance de tumeur *in vitro* avant d'être transféré aux patients. Une étude rétrospective a néanmoins démontré que la capacité des TIL à lyser la tumeur corrélait avec l'obtention d'une réponse clinique objective (222). La persistance des TIL transférés n'a cependant pas pu être démontrée.

En 2002, le Dr. Rosenberg et ses collègues ont introduit un traitement de chimiothérapie lymphodéplétante non-myéloablatrice préalablement à l'administration de TIL et d'IL-2. Cette lymphodéplétion avait pour but d'entraver les barrières que pourraient présenter les populations de lymphocytes déjà présentes chez l'hôte, comme les Treg, ou la compétition avec les lymphocytes résidents, pour les cytokines d'homéostasie comme l'IL-7 et l'IL-15 (222). *Dudley et al.* ont donc exploité cette avenue chez l'humain, avec 13 patients HLA-A2 atteints d'un mélanome, en administrant une chimiothérapie non myéloablatrice de cyclophosphamide et fludarabine. Sept jours plus tard, ces patients ont reçu une infusion de TIL autologues (en moyenne $7,8 \times 10^{10}$ cellules) sélectionnés *in vitro* pour leur forte réactivité envers les cellules tumorales sur la base de sécrétion d'IFN- γ

(Figure 8). Ces patients ont également reçu de l'IL-2 à forte dose (en moyenne 9 doses). Six des 13 patients ont développé une réponse clinique objective et 4 ont développé une réponse mixte soit la régression significative de certaines de leurs métastases sans l'apparition de nouvelles. Certains patients ayant développé une réponse anti-tumorale ont également présenté des signes évidents d'auto-immunité reliés au traitement comme du vitiligo (223). La cohorte a, par la suite, été augmentée à 35 patients et le taux de réponse clinique s'est maintenu à 51%, ce qui représente un taux de réponse clinique jamais atteint auparavant en immunothérapie à médiation cellulaire et très prometteur (224). Ces résultats ont été reproduits de façon indépendante et rapportés par le Dr. P. Hwu du *MD Anderson Cancer Center*, lors de la 25^{ième} rencontre annuelle (2010) de la *International Society for Biological Therapy of Cancer*.

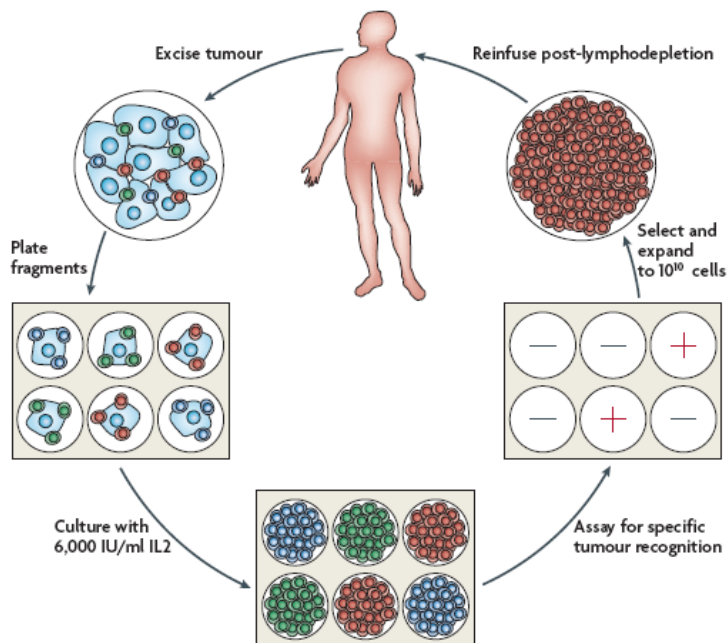


Figure 8. Cultures de lymphocytes ayant infiltrés des tumeurs pour un transfert adoptif

(Figure tirée de (222))

Légende : La tumeur est excisée, puis des cultures multiples sont débutées en présence de doses élevées d'IL-2. Les différentes cultures de lymphocytes ayant proliférées sont ensuite évaluées pour leur réactivité envers les tumeurs autologues ou allogéniques. Les cultures démontrant une forte reconnaissance des tumeurs subissent ensuite un protocole d'expansion rapide avec une stimulation à l'IL-2 et un anticorps anti-CD3. Lorsque les cellules ont atteint un nombre supérieur à 10^{10} , elles sont réinfusées au patient suivant l'administration d'une chimiothérapie lymphodéplétante, mais non-myéloablatrice.

Au milieu des années 2000, Dr. Rosenberg et ses collègues ont ajouté un traitement supplémentaire à leur protocole déjà existant : l'irradiation complète du corps par radiothérapie (TBI). Le traitement de radiothérapie avait pour but d'amplifier la lymphodéplétion, d'éliminer les MDSC et de stimuler l'activation du système immunitaire inné (225). Cette activation se fait par l'interaction de TLR, présents sur les APC, avec les lipopolysaccharides (LPS) provenant des bactéries intestinales, libérées dans les ganglions mésentériques, suite à la blessure de l'intestin par l'action directe du TBI (226). Suite à l'ajout du TBI, *Dudley et al.* ont rapporté une réponse clinique significative pour 52% des patients ayant reçu une dose modérée d'irradiation de 2 Gy et 72% chez les patients ayant reçu une dose de 12 Gy (227). Quinze patients, dans cet essai clinique, ont démontré une réponse complète avec la disparition de la maladie. Une réponse clinique objective chez 72% des patients atteints d'un mélanome réfractaire à tout autre traitement est certainement sans précédent. Les effets secondaires observés pour ce groupe se sont avérés cependant importants; certains patients ont dû être intubés suite à une détresse respiratoire et un certain nombre a également dû recevoir plusieurs produits sanguins dont des transfusions de plaquettes sanguines et de globules rouges (227). Malgré les résultats thérapeutiques obtenus, la TBI à dose élevée de 12 Gy en combinaison avec la chimiothérapie lymphodéplétante a été reconsidérée, étant donné les exigences physiques et les effets secondaires. Afin d'améliorer la proportion de réponses cliniques par transfert adoptif, les efforts portent maintenant sur l'amélioration de la culture des TIL *in vitro* et le choix de TIL transférés.

Young TIL

L'approche de préparation et de culture de TIL, décrite au dernier point, a été utilisée dans bon nombre d'essais jusqu'à tout récemment. Pour mener à terme la technique présentée en Figure 8, environ 8 semaines devaient s'écouler entre la biopsie et l'infusion du patient avec les TIL autologues hautement spécifiques à la tumeur. En fait, de

2002 à 2007, 402 patients atteints d'un mélanome de stade avancé ont été recrutés par le Dr. Rosenberg et ses collègues pour un total de 787 tumeurs. Sur ce nombre, 376 patients (94%) ont montré des TIL viables et 269 (67%) ont pu franchir la deuxième étape avec l'identification de TIL spécifiques aux tumeurs. En tenant compte de la prolifération et autres facteurs de culture, 107 patients (27%) des 402 patients originaux ont pu recevoir des infusions de TIL autologues hautement spécifiques à la tumeur (228). Afin d'améliorer ce faible pourcentage d'accessibilité au traitement et la lourdeur que représente la technique en temps et en ressources, *Dudley et al.* ont développé le protocole de *young* TIL (229). L'expansion des *young* TIL débute en cultures multiples comme précédemment, puis est rassemblée en une seule contrairement à l'ancienne technique où l'expansion était maintenue en microcultures séparées. L'étape de réactivité contre la tumeur par les TIL a également été enlevée. L'enrichissement des CD8⁺ est effectué avant l'expansion des cultures à grande échelle (230). Le protocole de *young* TIL s'échelonne donc sur environ 30 jours, avec une manipulation minimale des TIL.

Les *young* TIL présentent habituellement un phénotype moins différencié, avec une expression élevée des marqueurs de co-stimulation CD27 et CD28, ainsi que de longs télomères, ce qui corrèle avec une capacité de persistance après transfert plus élevée (231). Avec ce type de thérapie, 53% des patients recrutés ont reçu les TIL autologues, correspondant ainsi au double du nombre de patients en comparaison avec le protocole précédent. Les 2 protocoles montrent un niveau de performance clinique similaire, soit une réponse clinique objective similaire chez plus de 50% des patients (229). Il est envisageable que le protocole de *young* TIL puisse être transposé chez différents cancers autres que le mélanome, comme les cancers du poumon, du sein, de l'ovaire et du colon. La technique de culture de TIL, jadis utilisée, (Figure 8) favorisait de façon marquée le traitement chez le mélanome étant donné la forte présence de lymphocytes T reconnaissant des TAA, retrouvés spécialement dans ce cancer (229).

Lymphocytes T CD4⁺ Th

Le transfert adoptif de TIL se concentre majoritairement sur l'utilisation des T CD8⁺. Pourtant, le rôle crucial que joue les T CD4⁺ Th dans l'activation des T CD8⁺, dans la réponse immunitaire, est connu et a été discuté précédemment. Le rôle du Th dans la réponse anti-cancer, spécialement en immunothérapie, est peu connu et surtout controversé. La présence d'une population de Treg au sein des T CD4⁺, pouvant proliférer avec une plus grande capacité que les T CD4 Th1, suite à l'exposition à de fortes doses d'IL-2, pourrait contrecarrer l'effet positif des Th1. Les Treg ne sont évidemment pas souhaitables dans une thérapie anti-tumorale (217). Récemment, une nouvelle population de Th a été décrite, les Th17. Ces cellules normalement impliquées dans l'immunité, dans des réponses immunitaires dirigées contre certains pathogènes tel que *Mycobacterium tuberculosis*, sécrètent de l'IL-17 (232-234). Les Th17 intra-tumoraux sembleraient avoir un effet pro-tumoral en agissant sur l'angiogénèse, le recrutement de MDSC et la prolifération tumorale (235). À l'opposé, le transfert adoptif de cellules polarisées Th17, dans le modèle murin de mélanome B16, provoque une régression tumorale plus importante que des T CD4⁺ non polarisés (Th0) (236). Cette régression est cependant attribuable à une importante sécrétion d'IFN- γ en comparaison avec une faible sécrétion d'IL-17 (217). L'effet anti-tumoral observé est donc davantage imputable à la plasticité des Th17 à devenir des Th1, *in vivo*. De plus, il a récemment été suggéré chez la souris, que les Treg induits avaient la capacité de se transformer en Th17 et vice et versa (237). Il est difficile pour l'instant de prévoir l'impact de cette nouvelle donnée sur l'utilisation de ces cellules en transfert adoptif et chez l'humain, mais il est certes important d'en tenir compte pour les futurs essais.

En conclusion, le transfert adoptif de T CD4⁺, spécifiques à des TAA et polarisés Th1, pourraient peut-être contribuer à augmenter la réponse clinique de plus de 50% des patients traités avec la thérapie des *young* TIL. L'action auxiliaire des Th1 n'est indubitablement pas négligeable dans la réponse des T CD8⁺ lors d'infection. La combinaison du transfert adoptif avec des agents suppresseurs d'inhibiteur du système

immunitaire comme l'anticorps anti-CTLA-4 est probablement une des avenues envisagées aussi. Il sera également intéressant de voir les résultats de cette puissante forme d'immunothérapie dans les cancers autres que celui du mélanome.

1.4.3.2.3 Transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés

Récepteur de lymphocytes T (TCR)

Le transfert adoptif des lymphocytes T spécifiques à des antigènes viraux ou des TAA, ainsi que le transfert adoptif de TIL requièrent une étape importante de culture *in vitro*. Cette étape a pour but de faire proliférer les cellules de façon substantielle, mais également de "réveiller" ces lymphocytes qui sont pour la plupart dirigés contre des antigènes du "soi" et fréquemment possèdent un TCR de faible affinité. La culture *in vitro* augmente leur potentiel de réponse. Pour tenter de contourner le problème que pose les TCR de faible affinité, il est possible de transférer, aux T CD8⁺ du sang circulant, les gènes codant pour des TCR hautement spécifiques à des TAA. Cette approche permet rapidement de produire une grande quantité de T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre des TAA. Les gènes codant pour les TCR peuvent être préparés à partir de clones de T CD8⁺ présentant une forte avidité pour un épitope de TAA. Des vecteurs rétroviraux ou lentiviraux peuvent ensuite être utilisés pour transduire les lymphocytes et rediriger leur spécificité. Le TCR est composé de 2 chaînes (α et β) et ces chaînes sont composées chacune d'un domaine variable conférant la spécificité du TCR, et d'un domaine constant (Figure 9) (19). Un lymphocyte T transduit avec une construction de TCR spécifique à un TAA, se retrouve donc avec 2 TCR. L'insertion d'une séquence de région constante murine ou encore l'ajout de résidus de cystéine pour amener la formation d'un deuxième pont disulfure peut réduire de façon importante une association avec les chaînes du TCR déjà présent chez le lymphocyte mature (238).

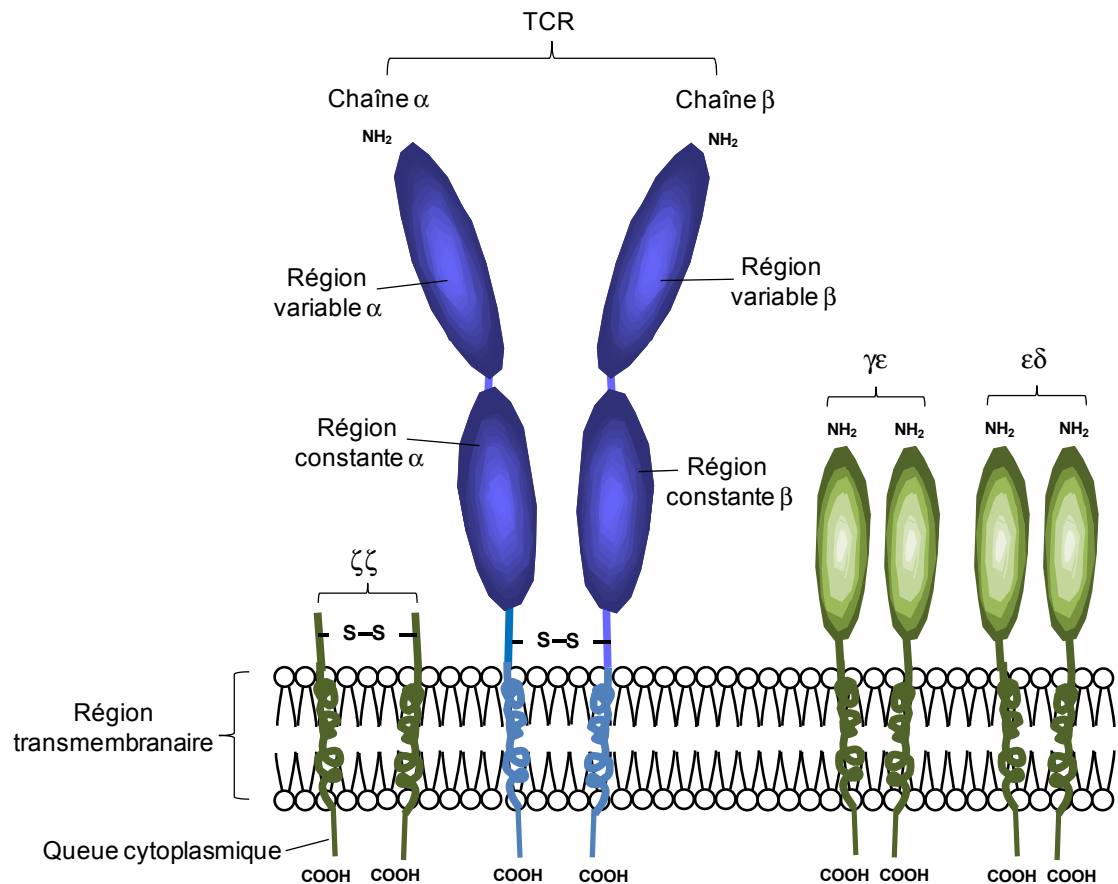


Figure 9. Représentation schématique de la structure d'un TCR $\alpha\beta$ et du complexe CD3 de lymphocyte T

Légende : Les chaînes α et β du TCR d'un lymphocyte T sont toutes 2 formées de 2 domaines affichant une structure de repliement d'immunoglobuline. Le domaine en position amino-terminale de chaque chaîne est variable ($V\alpha$ et $V\beta$) et contient trois régions hypervariables qui confèrent la spécificité du TCR. Chaque chaîne contient également un domaine constant ($C\alpha$ et $C\beta$), dont la séquence ne varie pas. Les 2 chaînes sont connectées par un pont disulfure entre les séquences constantes. La partie transmembranaire permet l'interaction avec le complexe CD3. Le complexe CD3 est constitué de l'homodimère $\zeta\zeta$ et les hétérodimères $\gamma\epsilon$ et $\epsilon\delta$. Les domaines externes des chaînes γ , ϵ et δ du complexe CD3 affichent aussi une structure de repliement d'immunoglobuline (19).

Encore une fois, le premier essai clinique réalisé avec lymphocytes T autologues transduits avec un TCR spécifique à un TAA a été réalisé par le groupe du Dr. Rosenberg. En 2006, *Morgan et al.* ont rapporté les résultats de cet essai clinique réalisé chez une cohorte de 15 patients atteints d'un mélanome métastatique (239). Pour réaliser cet essai, ils ont cloné un TCR reconnaissant spécifiquement un peptide de MART-1 présenté par CMH-1 HLA-A2, à partir des TIL d'un patient ayant obtenu une régression tumorale complète, suite à un transfert adoptif de TIL. Les lymphocytes T de sang périphériques des patients ont été traduits avec le TCR artificiel pour une efficacité variant de 17 à 67%. Le transfert adoptif des lymphocytes modifiés a été effectué suite à une chimiothérapie lymphodéplétante (même que pour transfert de TIL) avec l'administration d'IL-2. Un an après le début de cet essai, 2 patients de cette cohorte présentaient encore un taux de cellules transduites oscillant autour de 10% et une réponse clinique objective (RECIST) avec la régression de leurs métastases (239). Aucun de ces patients n'a développé de réponse auto-immune comme des rougeurs au niveau de la peau ou du vitiligo.

Suite à cette observation, Dr. Rosenberg et ses collègues ont émis l'hypothèse que ce TCR n'était peut-être pas assez affiné et qu'un TCR encore plus sensible serait plus efficace cliniquement à reconnaître l'antigène ciblé exprimé par les cellules malignes. Ils ont donc généré un nouveau TCR dirigé contre MART-1 avec une avidité encore plus grande à partir d'un T CD8⁺ humain. Vingt patients atteints d'un mélanome métastatique ont reçu les lymphocytes autologues transduits avec le TCR dirigé contre MART-1 par transfert adoptif, ainsi que des doses élevées d'IL-2. Tous les patients avaient également reçu une chimiothérapie lymphodéplétante pré-transfert. Une réponse clinique objective a été observée chez 30% des patients traités avec cependant de fortes réactions auto-immune contre les yeux et les oreilles engendrant même la perte d'audition et nécessitant l'administration d'un traitement aux stéroïdes (240). Cet essai a donc souligné que plus le TCR utilisé est affiné, plus la réponse anti-tumorale sera importante. Le risque encouru est par contre d'engendrer une réponse auto-immune dans les tissus normaux où le TAA est exprimé et ce, même en très faible quantité. Toujours avec l'équipe du Dr. Rosenberg, un

essai clinique utilisant des TCR dirigés contre les TAA p53 et gp100 induit chez une souris exprimant le gène HLA-A2 humain (souris transgénique), est présentement en cours. Aucun résultat clinique n'est encore disponible, mais ils ont tout récemment rapporté la production d'anticorps dirigés contre les TCR murins autant chez les patients présentant des signes de réponse que chez ceux n'en présentant aucun (241).

Dans une récente étude effectuée dans le modèle murin, *Bendle et al.* ont rapporté, suite à un transfert adoptif de lymphocytes transduits avec un TCR spécifiquement dirigé contre la protéine ovalbumine, une association mixte entre les chaînes γ et β du TCR transgénique et du TCR "résidant". Ces nouveaux TCR ainsi formés ont donné lieu à d'importants effets secondaires comme une cachexie sévère, une lymphopénie due à un appauvrissement de la moelle osseuse ainsi qu'une inflammation sévère au niveau de l'intestin et du pancréas (242). Ce genre de complication, dû à une association mixte des chaînes de TCR, n'est cependant pas rapportée chez l'humain grâce aux différentes manipulations tel que l'insertion d'un domaine constant murin dans la construction de TCR, comme mentionné précédemment. Néanmoins, afin de s'assurer que ce genre d'effets secondaires ne se produisent pas, certains investigateurs préconisent plutôt l'utilisation de TCR chimériques appelés : récepteurs chimériques d'antigènes (CAR) (243).

Récepteurs chimériques d'antigènes

Les CAR sont généralement générés par la jonction d'une chaîne lourde et d'une chaîne légère d'un anticorps monoclonal (région variable) avec la région transmembranaire et cytoplasmique d'une des chaînes de complexe CD3 (voir Figure 9) (244). Ainsi, les CAR combinent la spécificité de reconnaissance d'un anticorps avec la capacité de cytotoxicité du T CD8⁺ via le signalement de son TCR. L'activation du lymphocyte génétiquement modifié avec un CAR peut donc se faire sans la présentation d'un peptide par CMH-I. L'utilisation de CAR permet ainsi de contourner un des mécanismes d'évasion tumorale, soit la perte ou la diminution de la présentation par CMH-I (137).

Le premier essai clinique rapporté par Dr. E Oosterwijk et ses collègues en 2006 a été réalisé dans le cancer du rein avec un CAR dirigé contre l'anhydrase carbonique IX. Le récepteur était une construction chimérique murine et humaine. Le transfert adoptif était accompagné de doses élevées d'IL-2. Cet essai n'a pas pu être mené à terme, car des effets auto-immuns importants dirigés contre les cellules épithéliales du foie en ont forcé l'interruption (245). Cette réaction auto-immune s'expliquait par l'expression partagée du TAA ciblé par les cellules tumorales et le tissu normal hépatique. La leçon tirée de cet essai était une meilleure sélection de la cible choisie, celle-ci s'appliquant d'ailleurs à l'immunothérapie du cancer en générale. D'autres constructions de CAR ont été élaborées, comme par exemple des constructions incluant des molécules de co-stimulation comme le CD28 afin d'améliorer l'activation et la prolifération des T CD8⁺ transduits (246). Ceci a donné naissance à une deuxième génération de CAR, tenant compte du principe des 3 signaux d'activation soit le signal "1" médié par l'activation du TCR, le signal "2" provoqué par l'action du CD28 et le signal (Figure 10) "3" provoqué par la sécrétion de cytokines par la cellule elle-même ou par son entourage. *Emtage et al.* ont récemment rapporté les résultats d'essais pré-cliniques réalisés avec ce type de construction dirigé contre le TAA CEA. La présence du CD28 (domaine cytoplasmique), dans la construction, semble protéger les lymphocytes T transduits contre la mort cellulaire induite par l'activation d'une cellule sans la présence de co-stimulation. Les cellules transduites montrent une prolifération accélérée, suite au contact avec des lignées tumorales colorectales, sécrètent de grandes quantités d'IL-2 et d'IFN- γ et sont capables de supprimer les tumeurs dans un modèle murin de xénogreffe de tumeur humaine CEA positive (247). Un essai clinique se déroule présentement chez des patients avec un cancer CEA positif.

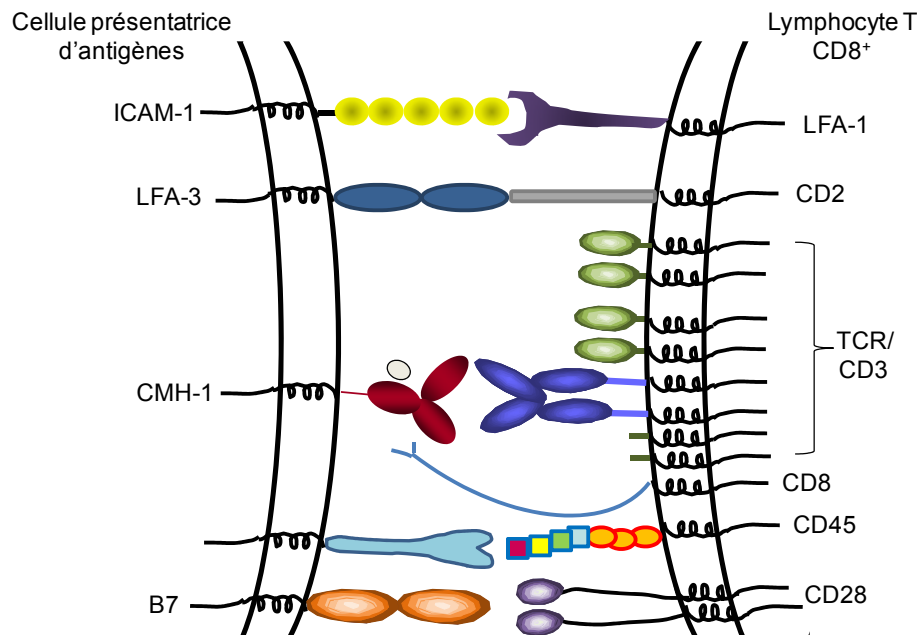


Figure 10. Molécules participant à l'activation d'un lymphocyte T CD8⁺

Légende : Représentation schématique des interactions entre le TCR d'un T CD8⁺ et le CMH-I d'une APC ainsi que différentes molécules accessoires et leur ligand. La liaison avec les différentes molécules accessoires permet une co-activation et une augmentation de la force d'interaction entre les 2 cellules (19).

Pour conclure sur ce type de transfert adoptif ainsi que sur l'immunothérapie à médiation cellulaire en générale, il est important d'évaluer jusqu'où les limites de l'affinité pour créer une réponse immunitaire contre des protéines du "soi" peuvent être poussées. Il est également important, par la même occasion, d'établir les limites de l'acceptable dans les réactions auto-immunes pouvant être engendrées par un traitement de haute efficacité.

1.4.4 Les défis de l'immunothérapie du cancer

L'évasion tumorale du système immunitaire est un point tendant de plus en plus vers une réalité admise. Les études et les différents essais cliniques menés en immunothérapie du cancer ont toutefois prouvé qu'il est possible d'utiliser le système immunitaire pour engendrer la destruction des tumeurs. Plusieurs obstacles doivent cependant être surmontés afin de parvenir à des traitements d'immunothérapie à médiation cellulaire efficaces pour un grand nombre de patients et transposables dans différents cancers. L'obtention d'un plus grand bénéfice clinique signifie que les investigateurs doivent se pencher sur différents points de la réponse immunitaire anti-tumorale et adopter des stratégies visant la manipulation de plusieurs de ces points.

Parmi les différents points à travailler dans la réponse immunitaire anti-tumorale, on retrouve l'augmentation de la force de la réponse des lymphocytes T, notamment par le blocage des molécules stoppant leur action (comme le CTLA-4) ou par l'inhibition de molécules immunosuppressives (comme l'IDO) ou la déplétion des Treg. Un second point à considérer est l'amélioration de la présentation antigénique par la stimulation des APC (agonistes des TLR). Un autre point à inclure dans un traitement efficace d'immunothérapie à médiation cellulaire est l'amélioration de la fonction et de la persistance des lymphocytes T. L'utilisation de différentes cytokines (comme l'IL-15, l'IL-7 et l'IL-21) ainsi que l'utilisation de certaines molécules pharmacologiques contribuant à la création de cellules mémoires et ne favorisant pas la prolifération des Treg représentent une partie importante de la stratégie (155, 248-250). L'identification de nouveaux TAA absents ou présentant une expression minimale, dans les tissus normaux pour le mélanome ainsi que pour d'autres cancers, est aussi un point de continuation à développer. L'identification de ces nouveaux TAA mènera, par le fait même, à l'identification de nouveaux TCR affins pouvant être utilisés dans un transfert adoptif sans engendrer de réponse auto-immune difficilement maîtrisable.

Finalement, le domaine de l'immunothérapie à médiation cellulaire doit s'intéresser à l'étude de la polyfonctionnalité des lymphocytes T activés *in vivo*, suite à une vaccination ou *in vitro*, pour un transfert adoptif. Ce concept s'attarde non pas sur la mise en évidence de la sécrétion d'une ou deux cytokines fréquemment étudiées, mais à l'ensemble des fonctions d'une cellule. La polyfonctionnalité est basée sur l'établissement du profil de sécrétion de différentes cytokines et enzymes cytolytiques produites par les cellules. L'étude de la polyfonctionnalité pourrait permettre d'établir le portrait des lymphocytes T dont l'action fera la différence entre une immunothérapie efficace à court, moyen et long terme et une immunothérapie vouée à l'échec.

1.5 Identification de nouveaux antigènes tumoraux dans les cancers communs

Comme il a été souligné, l'immunothérapie du cancer est une forme de traitement démontrant un fort potentiel. L'immunothérapie à médiation cellulaire représente cependant une intervention très personnalisée, adaptée selon le type de cancer et des paramètres spécifiques à chaque patient (type de HLA, TAA utilisés, éligibilité au transfert adoptif, etc...). Malgré les grandes avancées de ces dernières années et décrites dans les pages précédentes, il reste encore beaucoup d'amélioration à apporter, comme il a aussi été souligné. Parmi ces améliorations, nous avons retenu le besoin d'identification et de caractérisation de nouveaux antigènes tumoraux pour les cancers communs autres que le mélanome, principalement les cancers du sein et du poumon. Il existe différentes méthodes permettant l'identification de TAA. Ces méthodes seront décrites brièvement dans cette partie de même que la justification d'investiguer la candidature de Dickkopf-1 (DKK1) comme TAA dans les cancers communs.

1.5.1 Stratégie employée pour l'identification de nouveaux antigènes tumoraux

Depuis l'identification par le Dr. T. Boon et ses collègues du premier TAA chez l'humain retrouvé dans le mélanome, (110), l'identification et la caractérisation de nouveaux antigènes tumoraux ont rapidement évolué. À la base, la technique employée par le groupe du Dr. Boon avait été développée dans le modèle murin et consistait à créer une mutation dans une lignée cellulaire tumorale de souris produisant ainsi une lignée dont un gène était muté et qui, lorsque transplantée chez la souris syngénique, était rejetée par cette dernière. Les gènes mutés pouvaient résulter en de nouveaux antigènes reconnus par les T CD8⁺ de la souris, à la base de la réponse anti-tumorale. Afin d'identifier ces nouveaux antigènes, ils transfectaient la lignée tumorale non-mutée avec une banque d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) préparée à partir de la lignée mutée. Selon la reconnaissance des T CD8⁺ autologues pour certains des transfectants, ils pouvaient

procéder à l'identification de l'antigène ciblé (251). C'est donc en transposant cette technique chez l'humain, en utilisant des lignées cellulaires tumorales générées à partir de tumeur de mélanome, que le premier TAA humain a été cloné. Pour identifier le ou les peptides reconnus par les T CD8⁺, des fragments du gène codant pour l'antigène ont été transfectés afin de définir la région codante pour le peptide antigénique. Des peptides comportant certains a.a., occupant des positions connues pour augmenter l'affinité, ont été synthétisés pour un HLA donné (celui du patient d'où provenait la lignée cellulaire). Ces peptides ont ensuite été chargés sur les CMH-I de cellules cibles qui furent lysées, suite à la reconnaissance des peptides par les clones de T CD8⁺ générés chez ce même patient (252).

Une autre technique utilisée pour l'identification de TAA et leurs peptides est une technique biochimique qui consiste à éluer les peptides liés aux molécules de CMH-I se trouvant à la surface des cellules tumorales. Les peptides sont ensuite identifiés par spectrométrie de masse (253). L'avantage de cette méthode est qu'elle permet d'identifier des peptides de TAA naturellement présentés par les cellules tumorales (254).

Approche bio-informatique

L'identification de nouveaux TAA peut également être réalisée par l'analyse des protéines surexprimées au niveau des cellules tumorales ou affichant une ou plusieurs mutations. Les techniques d'hybridation microscopique de brins d'ADNc sur micro-matrice (communément appelé microarray) combinées aux outils bio-informatiques permettant la comparaison du niveau d'expression relatif de gènes dans les tissus tumoraux et normaux sont, entre autre, utilisés pour ce type d'identification. Les logiciels bio-informatiques comme le *Digital Gene Expression Displayer* (DGED) et les banques d'ADNc comme le *Serial analysis of gene expression* (SAGE), dont l'accès est publique, rendent cette approche facilement abordable (255, 256). Des peptides, découlant des protéines identifiées comme TAA candidats, sont ensuite sélectionnés pour leur potentiel à lier l'HLA d'intérêt. Les algorithmes de prédiction peptidique des Dr. KC. Parker et Dr. HG. Rammensee

permettent d'effectuer une sélection plus éclairée. Ces algorithmes sont basés sur la présence de motifs consensus permettant de prédire la liaison probable de peptides à certains types de HLA avec une plus grande affinité (257, 258). La sélection des peptides peut être raffinée davantage avec l'utilisation d'algorithmes de clivage par protéasome (259). Les peptides synthétiques sont ensuite chargés sur des APC et utilisés pour stimuler des lymphocytes T *in vitro* (260). Lors de l'utilisation de peptides synthétiques en culture, il est important de s'assurer de la bonne pureté des peptides afin de ne pas générer de faux positifs attribuables aux contaminants et produits incomplets de synthèse. L'utilisation de cette méthode ne garantit pas la présentation des peptides à la surface des cellules tumorales de façon naturelle. Cependant, cette approche est relativement facile à déployer et peut certainement mener vers l'identification de TAA valables (254).

Ainsi, dans le but de caractériser de nouveaux antigènes tumoraux dans le cancer du sein et autres cancers communs dont celui du poumon, nous avons privilégié l'analyse des banques d'ADNc. Cette technique nous a permis d'identifier 2 gènes candidats comme TAA potentiels : Dickkopf-1 (DKK1) et le *Prostate-derived Ets transcription factor* (PDEF). La caractérisation de PDEF a, par la suite, été approfondie par le Dr. S. Turcotte dans le cadre de son projet de maîtrise. La publication de ses travaux figure à l'ANNEXE I (il est à noter que je suis seconde auteure sur cet article). La SECTION 2 comprend la méthodologie pour l'identification et la caractérisation de l'expression de DKK1 dans le cancer du sein et autres cancers communs. La SECTION 3 décrit la méthodologie concernant l'identification de peptides de DKK1 reconnus par les T CD8⁺ d'un patient atteint d'un cancer du poumon et l'étude de la polyfonctionnalité d'un clone de T CD8⁺ spécifique à un peptide de DKK1.

1.5.2 Dickkopf-1 comme antigène tumoral candidat

Hypothèse du premier objectif du projet de doctorat

L'analyse des banques d'ADNc, par l'approche bio-informatique, a révélé une surexpression potentielle du gène DKK1 dans les tissus cancéreux de seins comparativement à une faible expression au niveau des tissus normaux. **Ces données préliminaires nous ont permis de poser l'hypothèse que DKK1 pourrait être un TAA candidat pour le cancer du sein.** Suite à l'obtention des résultats présentés dans la SECTION 2 et à la publication de d'autres études qui seront abordées plus tard, nous avons élargi l'hypothèse aux cancers communs. Nous présenterons ici les informations de base concernant DKK1.

Rôle de DKK1 dans la voie de Wnt

DKK1 a été identifié chez l'embryon de *Xenopus* par *Glinka et al.* en 1998, comme étant un membre des protéines inhibitrices sécrétées de la voie de *Wingless (Wnt)/Frizzled* (Figure 11) pouvant engendrer le développement de la tête. L'inhibition de l'action de DKK1, par l'utilisation d'un anticorps anti-DKK1, engendrait une microcéphalie chez l'embryon, suite à l'incapacité d'inhiber de la voie de Wnt (261). Les membres de la voie de signalisation de Wnt sont des glycoprotéines impliquées dans une gamme de processus touchant le développement au niveau fœtal, autant chez les invertébrés comme *Caenorhabditis elegans* pour les décisions touchant la différenciation des cellules souches, que chez les vertébrés dans le contrôle de la différenciation du système nerveux centrale (262, 263). On compte 19 variantes de la protéine Wnt, chez l'humain et la souris, pouvant stimuler plusieurs cascades de signalements cellulaires dont la voie dite "canonique" avec la β -catenin, la polarité planaire cellulaire (PCP, orientation des cellules selon un axe), la protéine kinase A et la voie de Src et c-Jun N-terminal kinase (264). Traditionnellement, les Wnt n'affectant pas les niveaux de β -catenin sont classés dans la catégorie dite "non-

canonique". Pour les besoins de cette étude, le focus sera porté sur la voie canonique seulement (Figure 11). La voie de Wnt joue également un rôle dans la formation des os en agissant principalement au niveau du maintien des ostéoblastes (265, 266). Un dérèglement de la voie de Wnt peut parfois aussi mener à un état malin (267). C'est d'ailleurs comme oncogène activé dans les tumeurs mammaires chez la souris que la protéine Wnt a été pour la première fois identifiée (268). Des mutations affectant certaines molécules de la voie de Wnt peuvent provoquer une activation constante de cette voie indépendamment de la présence d'inhibiteurs (269, 270). La voie de Wnt ne sera pas davantage approfondie pour l'instant, mais sera encore abordée dans le point 1.6 de cette SECTION.

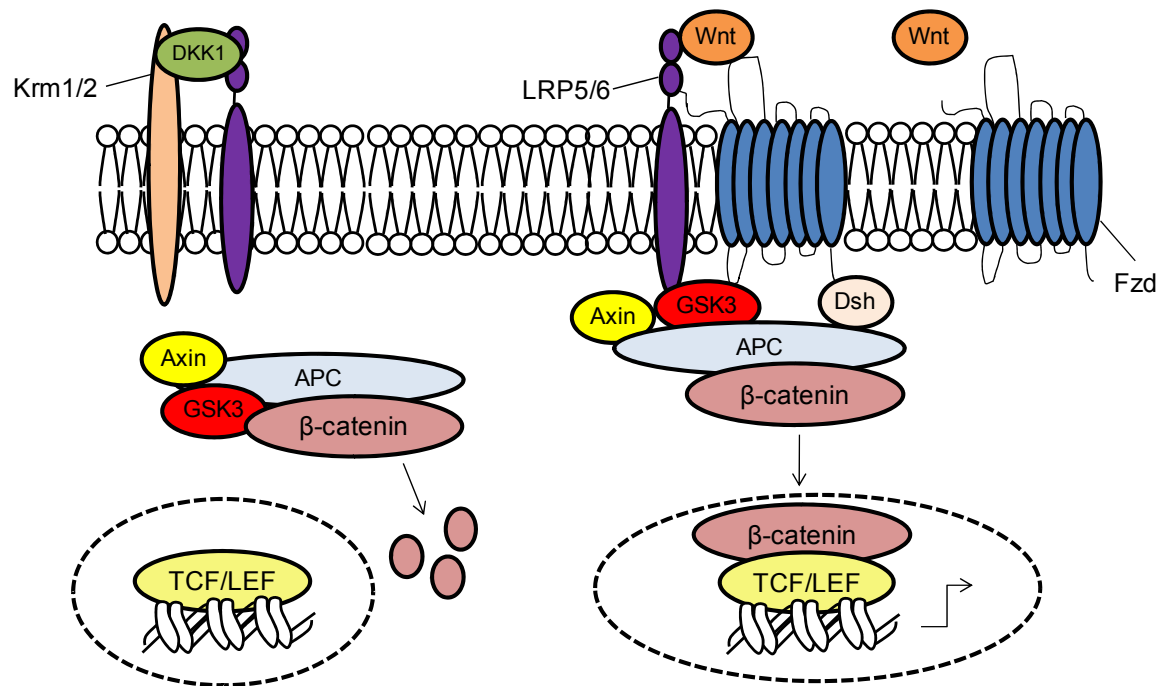


Figure 11. Inhibition (par DKK1 à gauche) et activation (droite) de la voie de Wnt/Frizzled

Légende : À droite La voie de Wnt dite "canonique" est stimulée par la liaison de Wnt au récepteur Frizzled (Fzd). Le complexe ainsi formé vient se lier au co-récepteur *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 5/6, ce qui a pour effet d'activer la molécule Dishevelled (Dsh) qui vient inhiber le complexe composé de la *glycogen synthetase kinase* (GSK)-3 β , l'Axin et le *adenomatous polyposis coli* (APC). Par phosphorylation de la β -catenin, ce complexe séquestre cette dernière dans le cytoplasme et médie sa dégradation rapide. L'inhibition de ce complexe amène la libération de la β -catenin dont les niveaux augmentent dans le cytoplasme. Une partie de la β -catenin est dirigée dans le noyau où elle s'associe avec les facteurs de transcription *T-cell factor* (TCF) et *lymphoid enhancer-binding factor* (LEF) pour réguler leur expression (271-273). À gauche Dickkopf (DKK1) 1 inhibe la voie canonique de Wnt en formant un complexe avec LRP 5/6 et Kremen (Krm) 1/2(274, 275).

La protéine DKK1 a été isolée et purifiée chez l'humain par *Fedi et al.*, un an après sa caractérisation chez le *Xenopus* (276). C'est avec l'idée d'isoler un nouveau facteur de croissance dans le surnageant d'une lignée cellulaire de léiomyosarcome (rare cancer du muscle lisse) qu'ils ont purifié la protéine initialement nommée Sk (d'après le nom de la lignée cellulaire). Sk était une protéine de 266 a.a., comportant deux domaines riches en cystéines. La protéine de 35 kDa ne présentait aucune similarité de structure avec les autres facteurs de croissance connus. Après avoir consulté la base de données GenBankTM, *Fedi et al.* ont finalement réalisé qu'il s'agissait de l'homologue humain de DKK1 qui lorsque co-transfecté avec Wnt-2, était capable d'inverser les effets de l'activation de la voie de Wnt (277). DKK1 est donc un puissant inhibiteur de la voie de Wnt. *Mao et al.* ainsi que *Bafico et al.* ont démontré que cette inhibition avait lieu suite à l'interaction de DKK1 avec le co-récepteur *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) 5/6, empêchant ainsi la liaison de ce dernier avec le complexe Wnt/Frizzled (Fzd) (Figure 11) (274, 278). Cette inhibition requiert seulement une faible quantité de DKK1 (279). La liaison de DKK1 avec LRP 5/6 ne se fait pas au même endroit que celle de LRP 5/6 avec le complexe Wnt/Fzd, mais implique une plus grande intensité de force dans l'interaction (274).

Comme il a été précisé plus tôt, DKK1 exerce un rôle important dans le développement, particulièrement au niveau de la formation de la tête, mais également au niveau de la formation des membres. Des souris DKK1^{-/-} meurent peu de temps après leur naissance et présentent des problèmes sévères de développement incluant une dysmorphogénèse au niveau de la tête et des membres (280). DKK1 joue également son rôle d'inhibiteur de la voie de Wnt dans le développement osseux du squelette (281). La déplétion d'une allèle de DKK1 induit une augmentation de la masse osseuse (282).

Expression de DKK1 dans les cancers

L'utilisation d'une approche bio-informatique pour l'identification de nouveaux antigènes tumoraux nous a révélé une surexpression potentielle de DKK1 dans les cancers

du sein. Au moment de débiter ce projet de doctorat, la littérature ne comportait pourtant aucune mention de cette expression dans le cancer du sein. En fait, la surexpression de DKK1 dans le cancer a été rapportée pour la première fois en 2003 par *Wirths et al.* dans l'hépatoblastome, une tumeur hépatique touchant les enfants et le néphroblastome (tumeur de Wilms), également un cancer pédiatrique rénal (283). L'expression de DKK1 dans ces cancers a été rapportée au niveau de l'acide ribonucléique messager (ARNm), mise en évidence par réactions en chaîne par polymérase (PCR) et immunobuvardage de type Northern. Cinq tumeurs de Wilms sur 6 étaient positives pour l'expression de DKK1 et 81% des 32 biopsies provenant d'hépatoblastomes étaient également positives pour l'expression de DKK1. Ironiquement, *Wirths et al.* mentionnaient ne pas avoir observé d'expression de DKK1 dans le cancer du sein (283). La deuxième mention de la surexpression de DKK1 dans les cancers a été rapportée par *Tian et al.* dans le myélome multiple, un cancer hématologique touchant les plasmocytes (lymphocytes B activés) (19, 284). Par l'utilisation de puces à ADN, ils ont démontré l'expression de DKK1 dans les plasmocytes de patients atteints de lésions osseuses, détectables ou non par résonnance magnétique. Ils ont également mis en évidence l'expression de la protéine dans les plasmocytes de patients atteints d'un myélome multiple comportant une ou plusieurs atteintes osseuses et l'absence de DKK1 chez les plasmocytes de patients sans atteintes osseuses et les sujets sains (284).

La SECTION 2 de cette thèse représente donc le troisième rapport de la surexpression de DKK1 dans le cancer, mais le premier dans les cancers communs. Après la publication de notre étude, d'autres groupes ont également rapporté la surexpression de DKK1 dans les cancers de l'œsophage, de la prostate, de l'ovaire, du pancréas et le carcinome hépato-cellulaire (285-289). De plus, certains groupes ont établi une corrélation entre l'expression de DKK1 et un mauvais pronostic. C'est le cas, entre autre, pour le cancer du poumon, mais également pour les cancers de l'ovaire, de la prostate, de l'œsophage et le carcinome hépato-cellulaire (285-287, 290, 291). Il n'y a que dans le cancer du colon que le groupe du Dr. JM. Gonzalez-Sancho a proposé DKK1 comme gène

suppresseur de tumeurs suite à l'observation d'une hyperméthylation du promoteur de DKK1 chez 17% de ces cancers et une corrélation entre l'inhibition de l'expression de DKK1 et les néoplasmes avancés (292, 293). Il est tout de même intéressant de constater le contraste des résultats obtenus dans le cancer du colon et la corrélation de l'expression de DKK1 avec un mauvais pronostic dans de nombreuses études sur les cancers autres qu'intestinaux.

Les données rapportées dans la littérature, avant la parution de notre étude présentée à la SECTION 2, ne permettaient pas de préciser l'ampleur de l'expression de DKK1 dans les cancers. C'est donc dans cette perspective que s'est inscrit notre travail duquel découle d'ailleurs certaines des études effectuées par la suite quant à l'expression de DKK1 dans les cancers énumérées précédemment.

1.6 Effets phénotypiques et fonctionnels de la modulation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T CD8⁺

Un des défis touchant l'immunothérapie du cancer, plus particulièrement le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺, est la persistance de ces derniers à long terme chez le patient. Récemment, des études effectuées chez différents modèles animaux ont tenté de définir le type de T CD8⁺ optimal à utiliser pour ce genre de traitement. En utilisant le singe comme modèle, *Berger et al.* ont démontré que l'utilisation de T CD8⁺ de type mémoire, plus précisément "mémoire central" (T_{CM}) (Figure 12), devaient être privilégiée pour un transfert adoptif; ce type de cellules persistant plus longtemps chez le récipient. Ce modèle était basé sur un transfert adoptif de clones de T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre des antigènes et générés *ex vivo* à partir de cellules montrant un phénotype de T_{CM} (294). Les lymphocytes T mémoires, dont les "mémoires effecteurs" (T_{EM}) (Figure 12) font également parties, constituent un bassin de cellules ayant échappées à la mort programmée, suivant généralement la phase d'expansion des cellules effectrices. Lorsque l'infection est contrôlée, ce ne sont que les cellules mémoires qui persistent dans l'organisme. Les cellules mémoires possèdent la capacité de répondre et de proliférer plus rapidement suite à une seconde infection requérant la même réponse antigénique que la première, mais à doses plus faibles (295, 296). La dissimilitude majeure observable dans le phénotype des T_{CM} et T_{EM}, permettant ainsi de les différencier, se situe au niveau de l'expression des molécules CD62L et CCR7 (Figure 12). Ces 2 marqueurs permettent l'entrée des lymphocytes dans les ganglions lymphatiques. Les T_{CM} expriment ces molécules, alors que les T_{EM} ne les expriment pas. Les T_{EM} peuvent toutefois exprimer d'autres molécules comme le CCR5, leur permettant ainsi d'infiltrer les tissus d'organes périphériques (297, 298).

Une étude, effectuée cette fois-ci à l'aide de modèles murins, est venue contredire les résultats observés chez les primates. *Hinrichs et al.* ont répondu directement aux observations de *Berger et al.* en comparant les résultats obtenus suivant le transfert adoptif de T CD8⁺ spécifiquement dirigés contre des antigènes générés *ex vivo* à partir de T_{CM},

mais également à partir de lymphocytes T naïfs (T_N) (299). *Hinrichs et al.* ont rapporté une meilleure réponse de cytokines après le transfert adoptif de cellules générées à partir de T_N , mais n'abordent pas la question de la persistance de ces cellules post-transfert. Dans une étude secondaire à celle-ci, *Hinrichs et al.* explorent encore la possibilité d'utiliser les T_N , cette fois chez l'humain, en transfert adoptif suite à une transduction des lymphocytes avec un TCR reconnaissant spécifiquement un TAA. Par cette étude *in vitro*, ils concluent que les T_N représenteraient la meilleure population à exploiter dans le transfert adoptif. Ces conclusions sont basées sur la présence de molécules de co-stimulation comme le CD27, la longueur des télomères retrouvés chez les T_N transduits et l'absence de différenciation complète des cellules, laissant présager un meilleur potentiel réplicatif post-transfert (300).

Ainsi, les 2 études diffèrent dans leur conclusion. L'utilisation de modèles différents peut expliquer cette dissemblance. On peut également se questionner sur le fait qu'une réponse anti-tumorale efficace, après transfert adoptif doit, se faire ou non au détriment de la persistance des cellules à long terme ou s'il est possible de combiner le meilleur des 2 mondes.

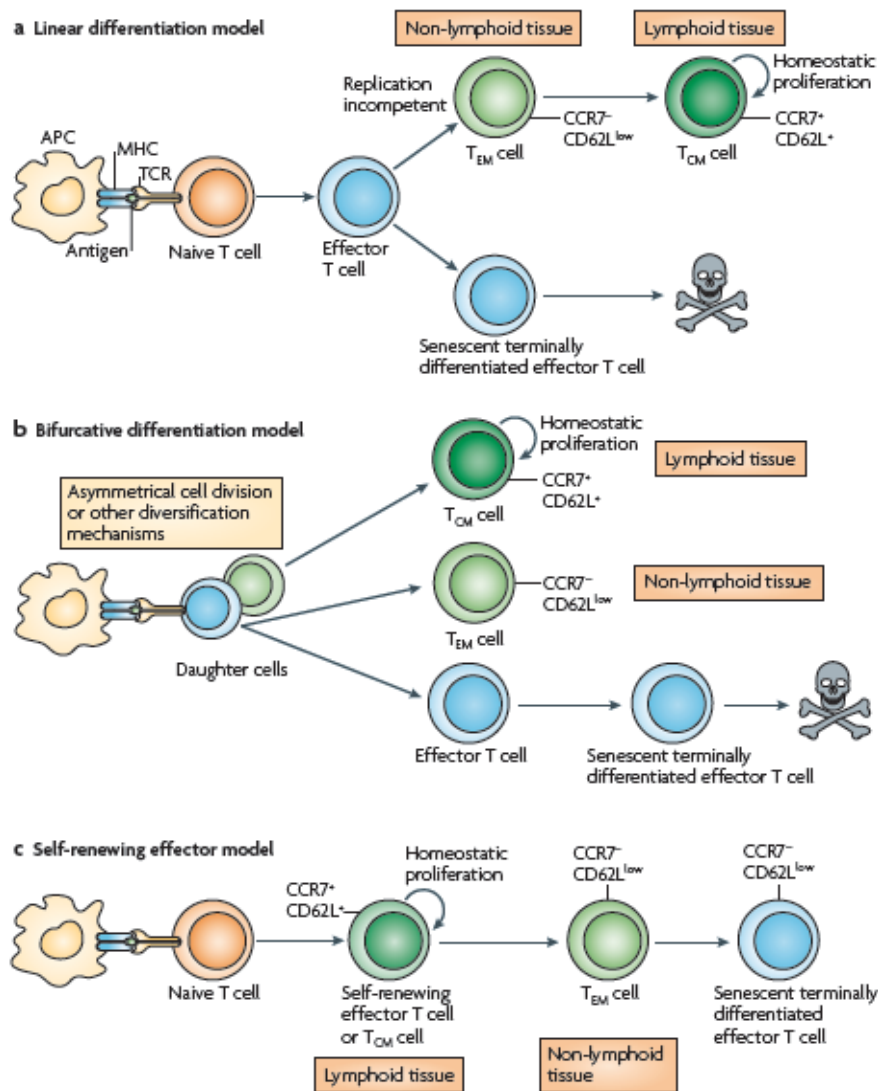


Figure 12. Possibilité de modèle pour la différenciation des lymphocytes T mémoires
(Figure tirée de (301))

Légende : A) Le modèle de différenciation linéaire. Le lymphocyte T naïf (T_N) est stimulé avec son antigène (en présence de différentes molécules de co-stimulation); il en résulte la génération d'un lymphocyte T effecteur. La majorité des lymphocytes effecteurs ainsi formés atteindront une différenciation en stade final et mourront par apoptose dans un court laps de temps suivant la clairance du pathogène. Un faible pourcentage des

lymphocytes T effecteurs se différencieront en lymphocytes T effecteurs mémoires (T_{EM}), exprimant de faibles taux de CD62L (L-sélectine) et pas de récepteur 7 de chimiokine-CC (CCR7). Les T_{EM} ne peuvent pas migrer dans les ganglions lymphatiques et ne peuvent pas se répliquer. Selon ce modèle, les T_{EM} ont la capacité de se différencier en lymphocytes T centrales mémoires (T_{CM}) possédant une capacité de persistance s'échelonnant sur une longue période, exprimant CD62L et CCR7 et pouvant migrer dans les ganglions lymphatiques pour proliférer de façon importante. **B) Le modèle de différenciation asymétrique.** Ce modèle propose que, suite à l'activation d'un T_N par la reconnaissance de son antigène, celui-ci donne lieu à 2 cellules filles possédant un destin différent qu'en à leur différenciation. La cellule fille distale donnera lieu à un T_{CM} et la cellule fille proximale donnera lieu à un T_{EM} ou un lymphocyte T effecteur voué à l'apoptose. Ce modèle est possible grâce à la division asymétrique. **C) Le modèle d'auto-renouvellement.** Ce modèle suggère qu'un T_N peut se différencier en T_{CM} ou en effecteur pouvant se renouveler par lui-même. Ces cellules peuvent migrer dans les tissus lymphoïdes et proliférer. Ces cellules pourraient également engendrer des T_{EM} pouvant migrer dans les tissus, aux sites d'infection, mais ne possédant pas de capacité d'auto-renouvellement. Dans ce modèle, les effecteurs ayant atteints un stade final de différenciation proviendraient des T_{EM} (301).

Suite à ces études et celles traitées dans le point suivant, nous avons développé davantage l'aspect "cellulaire" de la réponse anti-tumorale en tentant de moduler le phénotype des lymphocytes T $CD8^+$ utilisés pour le traitement adoptif dans le cadre de l'immunothérapie du cancer, en modulant la voie de Wnt. Nous avons élaboré une stratégie permettant un compromis entre l'utilisation des T_{CM} et des T_N . Ainsi, avec ce deuxième objectif, ce projet de doctorat permet d'intégrer la caractérisation d'une réponse spécifique à un antigène tumorale et l'étude du phénotype de lymphocytes T souhaité pour cette réponse. De plus, les 2 objectifs de ce projet se trouvent liés par un même élément, soit la voie de Wnt.

1.6.1 Stratégie employée dans la manipulation des lymphocytes T CD8⁺

Récemment, une nouvelle population de lymphocytes T mémoires a été décrite; les lymphocytes T à caractère partagé de cellules souches et mémoires (T_{SCM}). Cette population a été initialement décrite dans un modèle murin de la maladie du greffon contre l'hôte. La particularité de ces T_{SCM} réside dans l'expression de marqueurs de surface retrouvés typiquement chez les cellules mémoires de souris comme le CD122, mais également des marqueurs de T_N murins soit les CD44^{faible} et CD62L^{élevé}. Il a été démontré que les T_{SCM} étaient responsables de la persistance de la maladie. La capacité de ces cellules à persister et générer à la fois des T CD8⁺ effecteurs, des T_{CM} et des T_{EM}, en plus de pouvoir se renouveler elles-mêmes, leur a conféré l'appellation de cellules souches. L'appellation de cellules souches origine également du fait qu'elles expriment le marqueur murin de cellules souches Sca-1 (302). Toujours dans le modèle murin, *Gattinoni et al.* ont démontré qu'il était possible de produire ces T_{SCM} *in vitro*, suite à un traitement des T CD8⁺ avec l'inhibiteur pharmacologique de la GSK-3β, le TWS119 (4,6-disubstituted pyrrolopyrimidine). Ils ont tout d'abord démontré que le TWS119 permettait de réactiver la voie de Wnt chez les lymphocytes (au même titre qu'un traitement avec la molécule recombinante Wnt-3). Comme vu dans le point précédent et également représenté à la Figure 11, la GSK-3β fait partie du complexe dont le rôle est de séquestrer la β-catenin pour amener une dégradation rapide de cette dernière. De par sa capacité à lier la GSK-3β, le TWS119 inhibe son activité et engendre une accumulation de β-catenin (303). Le traitement au TWS119 par *Gattinoni et al* engendrait donc un phénotype de T_{SCM} chez les lymphocytes (Sca-1, CD122, Bcl-2, CD44^{faible} et CD62L^{élevé}), suite à une activation de la voie de Wnt. Ces cellules présentaient également une meilleure réponse anti-tumorale et une plus grande persistance suite à un transfert adoptif (304).

Hypothèse du deuxième objectif du projet de doctorat

Suite aux observations dans le modèle murin, **nous avons posé l'hypothèse que le TWS119 pourrait être utilisé pour modifier le phénotype et la qualité des T CD8⁺ humains vers un profil combiné de T_N et T_{CM}**. Ce type de T CD8⁺ ainsi créé pourrait être utilisé dans le transfert adoptif de cellules modifiées ou non génétiquement.

Afin d'éclaircir ce qu'implique l'activation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T matures, nous terminerons cette revue de littérature en abordant ce dernier point. Pour les besoins de cette étude, il sera donc question de la voie canonique de Wnt chez les lymphocytes T, en particulier les T CD8⁺.

1.6.2 La voie de Wnt dans les lymphocytes T

Implication de la voie de Wnt dans les thymocytes

La maturation des lymphocytes T, provenant des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, se déroule dans le thymus. Avant même d'atteindre ce stade, la voie de Wnt est reconnue comme jouant un rôle important dans le maintien des cellules souches hématopoïétiques en les préservant de la différenciation et en leur conférant un potentiel d'auto-renouvellement et de reconstitution des différentes populations sanguines (305, 306).

Il a été démontré, dans le modèle murin, que la voie canonique de Wnt jouait un rôle important dans le développement de la lignée lymphocytaire au niveau du thymus. C'est d'ailleurs chez les lymphocytes que les facteurs de transcription TCF et LEF ont été clonés à l'origine (307, 308). En stade très précoce du développement thymique, l'interaction de la β -catenin avec le TCF-1 au noyau a été rapportée par *Staal et al.* comme étant essentielle. Cette stabilisation de la β -catenin avec une translocation au noyau était provoquée par Wnt-1, mais également Wnt-4 (309). Ceci constitue le premier rapport de

l'implication de la voie de Wnt dans le développement thymique et donc le premier lien entre l'activation par Wnt et l'activité du facteur de transcription TCF-1 dans les lymphocytes immatures. À ce stade, il est impossible de différencier les T CD8⁺ des T CD4⁺ puisque les 2 populations sont confondues en une seule dite "double négative". Les thymocytes doubles négatifs évoluent selon 4 stades basés sur l'expression de certains marqueurs comme le CD25, dont l'expression n'est pas retrouvée sur les cellules débutant la phase double négative et celles se différenciant vers l'autre phase soit la double positive. Dans cette phase, les thymocytes co-expriment les molécules CD8 et CD4. Cette population est constituée de thymocytes ayant reçu une stimulation par leur pré-TCR et l'environnement thymique, leur conférant ainsi des signaux de survie et de différenciation. Dans la phase double positive, les thymocytes procèdent au réarrangement de leur TCR, car un TCR mature est essentiel pour passer du lymphocyte double positif au lymphocyte simple positif (T CD8⁺ ou T CD4⁺) (19). Le facteur TCF est exprimé tout au long de cette maturation et l'absence de ce dernier cause des problèmes dans la maturation des thymocytes, mais n'empêche pas de retrouver des populations simples négatives dans le thymus des souris TCF^{-/-} (310). Ces populations sont cependant considérées comme immatures. Il semblerait que le facteur de transcription LEF puisse compenser partiellement pour la perte du facteur TCF, car les souris à la fois TCF^{-/-} et LEF^{-/-} présentent une déficience aigüe de maturation de lymphocytes (310). L'absence de la β -catenin, spécifiquement au niveau des thymocytes, cause également une diminution de la population thymique suite à un développement inadéquat (311). Finalement, l'importance de la voie canonique de Wnt dans le développement des lymphocytes T, au niveau de la phase double négative, a aussi été démontrée par le blocage de maturation des thymocytes (humains et murins), suite à l'addition de DKK1. Cette addition en stade précoce de développement préserve les cellules en début de phase double négative (312).

Implication de la voie de Wnt dans les lymphocytes T matures

Si l'implication de la voie de Wnt dans le développement de lymphocytes T a été prouvée, sa possible activation chez les lymphocytes T matures n'est pas très claire. *Xu et al.* ont rapporté la possibilité que la β -catenin puisse être une des cibles du signallement intracellulaire du complexe TCR/CD3 chez les thymocytes, mais également chez les lymphocytes T matures. Bien que significatif, les taux de β -catenin retrouvés au noyau des lymphocytes activés étaient tout de même bas (311). Récemment, *Lovatt et Bijmaker* ont rapporté une stabilisation de la β -catenin chez les lymphocytes T matures humains, suite à une signalisation du TCR passant par l'inhibition de la GSK- β 3, mais via la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la phospholipase C (PKC) et non la voie de Wnt (313). Cette élévation de β -catenin atteint un maximum 8 heures après une stimulation du TCR par un anticorps agoniste et ne semble pas se faire au niveau de l'ARNm, mais bien par une stabilisation de la β -catenin. Ils font également l'observation de β -catenin phosphorylée dans le cytoplasme (50%) 72 heures après l'activation et de β -catenin phosphorylée ayant transloquée au noyau. Ceci est surprenant puisque, sous forme phosphorylée, la β -catenin devrait être dégradée. Les auteurs n'ont d'ailleurs aucune explication sur cette observation (313). Ils n'excluent pas non plus, que Wnt pourrait jouer un rôle supplémentaire, puisqu'il a été montré par *Gattinoni et al.* que l'ajout de Wnt-3a à des T CD8⁺ effecteurs permet aussi de stabiliser la β -catenin, sans proposer qu'il y ait un lien. L'implication de la voie de Wnt de façon naturelle chez le lymphocyte T mature demeure encore floue et la stabilisation de la β -catenin, suite à l'activation par le TCR, demande encore d'être approfondie.

Selon la littérature, on retrouve la mention d'une connexion entre la voie canonique de Wnt et les lymphocytes T mémoires centraux. Deux études, effectuées chez la souris, ont démontré que la stabilisation de la β -catenin et la présence du facteur de transcription TCF n'étaient pas retrouvées chez les T CD8⁺ effecteurs et T_{EM} (314, 315). De plus, une substitution du facteur TCF, n'empêchait aucunement les souris de répondre normalement

contre une première infection d'un pathogène, mais empêchait celles-ci de répondre contre une seconde infection. Les précurseurs de T CD8⁺ mémoires centraux n'étaient pas présents chez ces souris, suggérant ainsi l'importance du TCF dans la programmation des lymphocytes mémoires centrales (314). *Zhao et al.* ont fait un constat similaire en démontrant le TCF régulé à la baisse chez les T CD8⁺ effecteurs et à la hausse chez les T CD8⁺ mémoires exprimant le CD62L (T_{CM}) (315). Ils ont également montré que lorsqu'ils forçaient l'expression du TCF combinée avec la stabilisation de la β -catenin, ils obtenaient une meilleure réponse contre les antigènes, suite à une seconde infection. Les T CD8⁺ ainsi activés sécrétaient aussi de l'IL-2, laissant ainsi présager une réponse de cellules mémoires. Bien que, comme chez les T CD8⁺, une expression forcée de TCF ait donnée une augmentation du nombre de T CD4⁺ spécifiques à un antigène lors d'une première infection, leurs réponses et leurs expansions, suite à une deuxième infection, ne s'en sont pas trouvées améliorées. Ces 2 études, bien que pertinentes, comportent toutes 2 une faille quant à la preuve de l'implication de la voie de Wnt de façon globale. Ces études n'étudient pas les événements pouvant se produire en amont de la stabilisation de la β -catenin. Elles démontrent cependant une implication de la β -catenin et du TCF dans la formation des lymphocytes T CD8⁺ mémoires et suscitent un intérêt quant à la perspective de l'utilisation de ces 2 acteurs, afin de favoriser la génération de T CD8⁺ mémoires, lors d'intervention comme la vaccination chez l'humain.

1.7 Objectifs du projet de doctorat

Les traitements couramment employés contre le cancer, dont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie, ne sont pas suffisants pour abaisser significativement les statistiques de mortalité pour les cancers communs comme ceux du poumon et du sein. Une des difficultés rencontrées est entre autre attribuable au fait que certains de ces cancers soient réfractaires aux traitements traditionnels. La signature particulière et partagée par des minorités de cancers touchant un même organe, comme le sein, demande le développement de traitements plus personnalisés. Il appert que le développement des différentes sphères de l'immunothérapie tumorale semble plus que prometteur. Néanmoins, bien que ce type de traitement montre des résultats spectaculaires chez certains patients réfractaires à tout autre traitement, bons nombres d'améliorations sont à envisager. Parmi les points à développer concernant l'immunothérapie à médiation cellulaire, on retrouve le besoin d'élargir l'immunothérapie à des cancers communs autres que le mélanome, dans l'optique de la vaccination ou le transfert adoptif de lymphocytes (génétiquement modifiés ou non). Un autre point problématique est la récurrence, souvent observée chez certains patients traités par immunothérapie. Ce point demande des recherches pour diversifier la réponse anti-tumorale, afin d'éviter la sélection clonale, c'est-à-dire l'émergence de cellules tumorales ayant échappées au système immunitaire entre autre par l'absence d'expression des molécules ciblées par la thérapie. La problématique de récurrence impose également le développement de thérapie dont les agents protecteurs perdurent après l'administration du traitement.

Ce projet de doctorat a donc comme objectif global l'amélioration de l'immunothérapie à médiation cellulaire dans le contexte des cancers communs autre que le mélanome. Ce projet comporte 2 objectifs appuyés de 2 hypothèses distinctes. Les travaux présentés dans le cadre du premier objectif sont exposés dans les 2 prochaines sections et les travaux présentés dans le cadre du deuxième objectif figurent à la SECTION 4.

1) Le premier objectif de ce projet de doctorat était d'identifier et de caractériser de nouveaux antigènes tumoraux pouvant être utilisés dans un traitement par immunothérapie, dans le contexte des cancers communs comme ceux du sein et du poumon. La prédiction de la surexpression de DKK1 dans les cancers du sein, générée par une approche bio-informatique, a donné naissance à l'hypothèse de cet objectif soit que DKK1 pourrait être utilisé comme TAA pour les cancers communs. Cet objectif s'intéresse donc premièrement à la caractérisation de l'expression de DKK1 dans les cancers communs. Il vise également l'identification de peptides de DKK1 pouvant être reconnus par les T CD8⁺ et par le fait même, l'identification de T CD8⁺ capables de reconnaître DKK1. Finalement, la caractérisation de la réponse de ces lymphocytes spécifiquement dirigés contre DKK1 par l'étude de la polyfonctionnalité fait aussi partie de cet objectif. Cette étude peut ainsi mener à l'identification de peptides de DKK1 pouvant être utilisés en vaccination anti-cancer et prédire la réponse des lymphocytes suscités par cette vaccination. Elle peut également permettre l'identification de nouveaux TCR dirigés contre un nouvel TAA, pouvant être utilisé en transfert adoptif de lymphocytes génétiquement modifiés.

2) Le deuxième objectif était d'améliorer la réponse anti-tumorale par la manipulation des lymphocytes T CD8⁺. Cet objectif s'intéresse à l'étude du phénotype et de la fonction des T CD8⁺ suite à la modulation de la voie de Wnt. Cet objectif repose sur l'hypothèse que l'activateur pharmacologique de la voie de Wnt, le TWS119, pourrait être utilisé pour modifier le phénotype et la qualité des T CD8⁺ humains vers un profil combiné de T_N et T_{CM}. Cette étude cherche à établir le potentiel de l'utilisation du TWS119 et par le fait même, l'activation de la voie de Wnt, dans la préparation *in vitro* de lymphocytes utilisés dans un transfert adoptif.

Elle comporte des résultats supplémentaires montrant différentes analyses du phénotype de lymphocytes T CD8⁺ cultivés en présence d'un activateur pharmacologique de la voie de Wnt.

SECTION 2. MANUSCRIT 1

The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types

The British Journal of Cancer, 2007 Feb 26, 96(4): 646-653.

Marie-Andrée Forget¹, Simon Turcotte¹, Diane Beauseigle¹, Jessica Godin-Ethier¹, Sandy Pelletier¹, Jocelyne Martin¹, Simon Tanguay² and Réjean Lapointe^{1*}

¹ Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Département de médecine, Université de Montréal, et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² McGill University Health Centre, Montreal General Hospital, Montréal, Québec, Canada.

Running title: DKK1 in breast cancer

Key words : Dickkopf-1 (DKK1) ; breast cancer; kidney cancer; prognostic and diagnostic marker

M.-A. Forget est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche. La rédaction de cet article a été réalisé par M.-A. Forget en collaboration avec R.Lapointe. S.Turcotte a participé à la réalisation des statistiques et a apporté une contribution critique. D. Beauseigle, J.Godin-Ethier et S. Pelletier ont apporté une contribution technique. D. Beauseigle est également responsable des travaux présentés la fig.2A. J. Martin et S. Tanguay ont contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

In addition to new tumour antigens, new prognostic and diagnostic markers are needed for common cancers. In this study, we report the expression of Dickkopf-1 (DKK1) in multiple common cancers. This constitutes a comprehensive analysis of the DKK1 expression profile. DKK1 expression was evaluated by classical and quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) for protein determination, in cancer lines and clinical specimens of several cancer origins. For breast cancer, expression was correlated with clinicopathological parameters. DKK1 expression was confirmed in several cancer cell lines derived from breast, and other common cancers. DKK1 protein secretion was documented in breast, prostate and lung cancer lines, but was negligible in melanoma. Analysis of DKK1 expression in human cancer specimens revealed DKK1 expression in breast (21/73), lung (11/23) and kidney cancers (6/20). Interestingly, DKK1 was preferentially expressed in estrogen and progesterone receptor-negative tumours (ER⁻/PR⁻; $p=0.024$) and in tumours from women with a family history of breast cancer ($p=0.024$). Importantly, DKK1 protein production was confirmed in multiple breast cancer specimens that were positive by RT-PCR. This work establishes DKK1 as a potential prognostic and diagnostic marker for cohorts of breast cancer patients with poor prognosis. DKK1 may also become a relevant candidate target for immunotherapy of different cancers.

Abbreviations:

ATCC: American Type Culture Collection

CGAP: Cancer genome anatomy project

DGED: Digital gene expression displayer

DKK1: Dickkopf-1

EBV: Epstein-Barr virus

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent Assay

ER: estrogen receptor

EST: Expressed sequence tag

Fz: Frizzles

HEK: Human embryonic kidney

PDEF: prostate Ets transcription factor

PBMC: Peripheral blood mononuclear cell

PR: Progesterone receptor

RT-PCR: Reverse transcriptase – polymerase chain reaction

SAGE: Serial analysis of gene expression

TA: Tumor antigen

Introduction

Neoplasia frequently results in an aberrant protein expression profile, including proteins involved in embryogenesis. For example, alpha-fetoprotein, which is a fetal serum protein (Taketa, 1990), is also expressed in hepatocellular carcinoma. Frequently, such genes involved in embryogenesis and fetal development are re-activated in tumours and may be implicated in the neoplasia process. The expression of some of these proteins can be exploited as tumour markers (Gorog *et al*, 2005), serves in diagnosis, prognosis, and in monitoring of relapse or treatment effectiveness. Specifically, very few secreted tumour markers are available for the management of common cancers. In addition, such highly-specific secreted proteins could be targeted as tumour antigens (TA) for tumour immunotherapy.

Here, we report the expression of Dickkopf-1 (DKK1) in breast cancer and other tumours. DKK1 is a secreted protein involved in embryonic development. Specifically, Wnt-1 protein binds to the frizzled receptor (Fz) and the low-density lipoprotein receptor-related protein-5/6 (LRP5/6), triggering signals important for proliferation via β -catenin. DKK1 binds to LRP5/6 (Semenov *et al*, 2001), and blocks interaction with Wnt-1 resulting in β -catenin degradation and effects on proliferation (Mao *et al*, 2002). Interestingly, DKK1 expression in cancer has been described previously, mainly in multiple myeloma (Tian *et al*, 2003), hepatoblastomas and Wilms' tumours (Wirths *et al*, 2003).

In the present work, we exploited publicly-available expression tissue libraries with digital differential display bio-informatic tools to highlight genes specifically expressed in breast cancer but absent from normal tissues critical for body functions. Among the different genes listed, we confirmed that DKK1 was expressed in breast cancer cells, with restricted expression in the placenta. DKK1 appears to be preferentially expressed in hormone-independent tumours and in tumours from women with a family history of breast

cancer. Interestingly, the expression of this gene has been confirmed in cancers of other origins, such as the lung, kidney and melanoma. This work establishes DKK1 as a potential prognostic and diagnostic marker of aggressive breast cancer types. In addition, DKK1 could be valuable for detecting lung and kidney cancers, for which no reliable secreted marker is available. Finally, DKK1 has become a relevant candidate target for immunotherapeutic approaches to different cancers, and it may also have potential in a preventive vaccination strategy for women at high risk of developing breast cancer.

Materials and Methods

Bio-informatic tools for differential gene expression in breast cancer compared to normal tissues

To find candidate genes, we exploited the Digital Gene Expression Displayer (DGED), a bio-informatic tool freely available from the Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ncicgap/>) (Strausberg *et al*, 2000), probing 2 different cDNA expression libraries, Expressed Sequence Tag (EST; <http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/GXS>) and Serial Analysis of Gene Expression (SAGE; <http://cgap.nci.nih.gov/SAGE/SDGED?METHOD=SS10,LS10&ORG=Hs>). These bio-informatic tools allowed the analysis of expression profiles from the EST and SAGE databases by the clustering of libraries by origin. All the available libraries prepared from normal tissues were clustered in 1 group, and all available libraries prepared from breast cancers were clustered in a second distinct group. Candidate genes were selected on the basis of high expression levels in available human breast cancer libraries, and absent or low levels in normal human tissues from important organs.

Cell culture

The breast cancer cell lines MCF-7, MDA231, BT-20, HCC1428 BRCA, and HCC2218 BRCA were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). B lymphocytes immortalized with Epstein-Barr virus (EBV) HCC1428 and HCC2218, as well as the lung cancer lines Calu6, H1299, A549, H460 and H596, the prostate cancer lines DU145, PC-3 and LNCaP, and the human embryonic kidney (HEK) line 293T were obtained from the ATCC. The melanoma lines 397mel, 537mel, 586mel, 888mel, 1087mel, 1088mel, 1278mel, 1300mel, 1337mel and MelS-FB and the kidney cancer line RCC-W were all established at the Surgery Branch of the National Cancer

Institute (NCI/NIH), and the SK23 line was acquired from the ATCC. The ovarian cancer line SKOV3 was also kindly provided by the Surgery Branch. Most of the cell lines were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen; Carlsbad, CA; and Wisent; St-Bruno, Québec, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Invitrogen and Wisent), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin (Invitrogen) and 10 µg/mL gentamicin (Invitrogen). For the HCC breast cancer lines and their corresponding EBV-B lines, 10 mM HEPES solution (Invitrogen) and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen) were added to the culture medium.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected from healthy donors recruited by Dr. Jean-Pierre Routy at the McGill University Health Centre (MUHC, Royal Victoria Hospital, Montréal, Québec, Canada). The PBMC were prepared from blood by centrifugation on a lymphocyte separation medium (Cellgro, Herndon, VA and Wisent). To generate CD40-activated B cell cultures (CD40-B), B cells from bulk PBMC were cultured with 500 ng/mL soluble trimeric CD40L (Immunex Corporation; Seattle, WA) and 250 U/mL recombinant human IL-4 (Peprotech; Rocky Hill, NJ) in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Invitrogen) supplemented with 7.5% human serum (heat-inactivated, prepared from normal donors), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin. Fresh Iscove medium was added on day 3 with 250 U/mL IL-4 and 250 ng/mL CD40L as described previously (Lapointe et al, 2003). For T lymphocyte cultures, PBMC were incubated in complete medium consisting of AIM-V medium (Invitrogen) supplemented with 5% human AB serum (heat-inactivated; Gemini Bio-Products; Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 µg/mL gentamicin (all from Invitrogen), and supplemented with 300 IU/mL recombinant human IL-2 (Chiron; Emeryville, CA) and 30 ng/mL of agonistic anti-CD3 (OKT3, eBiosciences, San Diego, CA) or 5 µg/mL of phytohemagglutinin (PHA, Sigma; Oakville Ontario, Canada).

Clinical specimens

Breast cancer specimens of 1.5 cm or higher were provided by the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) Cancer Network breast tissue library of CHUM - Hôpital Notre-Dame and Hôpital Hôtel-Dieu (specimens stabilized in RNAlater™, Sigma; for RT-PCR analyses). Lung cancer specimens were obtained after resection in the Thoracic Surgery Department of CHUM – Hôpital Notre-Dame (5 samples; stabilized in RNAlater), and all others were acquired from the Lung Cancer Tissue Library of the FRSQ Respiratory Health Network of Hôpital Laval (Québec, Québec, Canada; snap-frozen tumour pieces). Kidney cancer specimens were collected after partial or total kidney resection at the Montreal General Hospital (MUHC).

Snap-frozen and RNAlater-stabilized cancer samples were homogenized with a Medimachine™ (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. RNA was prepared with Qiazol reagent (QIAGEN GmbH; Hilden, Germany), followed by a cleanup and concentration procedure using the RNeasy™ Mini or Micro Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

The status of the estrogen and progesterone receptors in the breast cancer specimens was determined by the clinical pathology services of CHUM - Hôpital Notre-Dame and Hôpital Hôtel-Dieu.

Reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR)

RNA from cell lines and lymphocytes was prepared with RNeasy™ Mini or Micro Kits (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. Intron-spanning PCR primers were designed from genes selected by the bio-informatic approach. To perform classical and quantitative RT-PCR analyses, cDNA was first synthesized from mRNA (1 µg) with oligo-dt (Invitrogen) using an Omniscript Reverse Transcriptase Kit (QIAGEN). Classical

RT-PCR amplification was undertaken with the HotStartTaq DNA Polymerase (QIAGEN). The cycling conditions were 15 min at 95°C, 24 (β -actin) or 32 (DKK1 and other genes) cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec at 55°C, 1 min at 72°C, with a final extension of 10 min at 72°C, in a T3 Thermocycler™ system (Biometra, Goettingen, Germany). The primer sequences for β -actin were: 5': GGAAGGCTGGAAGAGTGCC; and 3': GTGATGGTGGGCATGGGTC, resulting in a 700-bp amplicon. Amplification was detected by ethidium bromide staining after electrophoresis migration in agarose gel (1.5 or 2%; with apparatus from Bio-Rad, Hercules, CA). The primer sequences were as follows: DKK1 (5' primer: ATTCCAACGCTATCAAGAACC; 3' primer: CCAAGGTGCTATGATCATTACC, amplicon 383 bp),

For quantitative real-time RT-PCR, amplification was performed in a LightCycler™ system (Roche; Mannheim, Germany) and revealed with a SYBR Green™ kit (Quantitect™ SYBR Green PCR, QIAGEN). Standard curves for each gene were established to quantify the number of copies for each sample, and expression was considered only when the sample Ct was within the limit of each standard curve. The cycling conditions were 15 min at 95°C, 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 55°C, 30 sec at 72°C and 5 sec at 82°C (β -actin) or 84°C (DKK1). The primer sequences for real-time PCR were: β -actin 5': AAGGCCAACCGCGAG; 3': TAATGTCACGCACGATTCCCG; DKK1 5': CTCGGTTCTCAATTCCAACG; 3': GCACTCCTCGTCCTCTG. Finally, amplification of the relevant amplicon was confirmed by separation on agarose (2%) gel, revealed as mentioned earlier. β -actin was exploited as a housekeeping gene. A sample was considered positive for DKK1 when amplification was >200 copies of DKK1 per 10⁵ copies of β -actin. This threshold value was established considering that the expression levels in normal tissues were less than 200 copies, with the exception of the placenta.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Cancer cell lines and lymphocyte culture medium were tested for the presence of secreted DKK1 protein by ELISA. Cells were seeded at 1×10^5 cells/well in flat-bottom 96-well plates (Corning Inc.; Corning, NY). Supernatants were harvested after 24 hours and assayed for DKK1 with the commercial DuoSet Human DKK1 ELISA Kit, as recommended by the manufacturer (R&D Systems; Minneapolis, MN). The lowest standard point for the ELISA assay was 62 pg/mL.

DKK1 protein production was also quantified in breast cancer lysates. Freshly-resected breast cancer specimens provided by the FRSQ Cancer Network (as mentioned earlier) were mechanically homogenized in complete AIM-V medium with the Medimachine (Dako Cytomation) to obtain a single cell suspension. Lysates were prepared by 5 rapid subsequent freeze/thaw cycles (Lapointe *et al*, 2003). Cell debris were sedimented, and supernatants were assayed for DKK1 as described above. Cell line lysates used as controls were prepared by the same technique, from 1×10^7 cells/mL suspension.

Statistical analyses

Mean values of DKK1 expression were compared by clinico-pathological clusters with the 2-tailed t test for independent samples. DKK1-positive tumours were compared to DKK1-negative tumours for the same clusters, using the 2-sided Pearson Chi-square test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Statistics were performed with SPSS 13.0 software for Windows (LEAD Technologies, Chicago, IL).

Results

DKK1 expression in breast cancer cell lines

We originally intended to find new TA for potential applications in immunotherapy, by exploiting the DGED. This bio-informatic approach was used as a screening tool to highlight potential overexpressed genes in breast cancer. This list of genes predicted by these banks (supplementary data, Table I^{ml}) was considered as preliminary data needing to be further investigated. By using these mining tools, some genes predicted to be practically absent from normal tissues later showed expression in various normal tissues by RT-PCR analyses (e.g. Myl5 and S100A7 for example; supplementary data, Figures 1^{ml} and 2^{ml}). This demonstrates the importance of confirming the expression profile of genes predicted with the DGED.

Dickkopf-1, a modulator of the Wnt pathway, emerged as a candidate overexpressed gene, however, to validate the SAGE database information, the expression profile was further analyzed and confirmed by RT-PCR. RNA was first prepared from the different cell lines of breast cancer, and other origins. Negative control cells included PBMC and cultured, activated lymphocytes to eliminate the possibility of this gene being expressed in proliferative cells. Intron-spanning PCR primers were designed for the RT-PCR analysis. Dickkopf-1 expression was confirmed in breast cancer lines but not in activated lymphocytes (Figure 1^{ml}A). High DKK1 protein secretion was confirmed in culture supernatants harvested from 3 breast cell lines (MDA231, MCF-7 and HCC1428; Figure 1^{ml}B). Interestingly, no DKK1 was detected in the HCC1428 EBV-B cell lines, and a very low amount was found in BT-20, which reflects the faint band in RT-PCR (Figure 1^{ml}A).

In summary, we have validated the expression, in breast cancer lines, of a gene previously selected by the bio-informatic approach. Although TA are frequently expressed

in both fresh tumour samples and tumour cell lines, confirmation of expression in fresh breast cancer specimens is essential. Also, limited expression in normal tissues needed to be evaluated.

DKK1 is expressed in the placenta

Classical and quantitative real-time RT-PCR approaches were next adopted to evaluate DKK1 expression in normal tissues. Dickkopf-1 was found exclusively in the placenta, as reported previously (Figure 2^{m1}A) (Fedi *et al*, 1999). His restricted expression to the placenta was further confirmed in a second cDNA panel prepared from normal tissues (Figure 2^{m1}B). We also exploited quantitative real-time RT-PCR to further validate this observation (Figure 2^{m1}C). Critically, we confirmed DKK1 expression in the placenta with 2 distinct, commercially-available mRNAs prepared from normal tissues (Origene, Rockville, MD and BD-Clontech, Mountain View, CA), and a weak detection in some normal tissues. Minimal DKK1 expression was further confirmed from normal breast tissues prepared from 5 different donors (Figure 2^{m1}D).

Preferential expression of DKK1 in hormone-resistant breast cancer, in familial cases and in primary tumours from patients with invaded axillary nodes

To further characterize DKK1 expression in breast cancer tumours, we next assessed DKK1 expression profiles in clinical breast cancer specimens. Globally, DKK1 was detected in 21 out of 73 patient specimens evaluated (Figure 3^{m1}A). The expression profile was clustered based on clinicopathological parameters characterizing breast cancer. DKK1 expression profile was first analyzed according to hormone receptors status (estrogen and progesterone receptors; Figure 3^{m1}A). Precisely, in DKK1⁺ tumours, the mRNA level was significantly higher in ER⁻/PR⁻ compared to other tumours (respectively

818 vs 213 DKK1 mRNA copies/ 10^5 β -actin copies, $p=0.009$; Figure 3^{ml}B). Also, as shown in Figure 3^{ml}C, a statistical difference was demonstrated in the preferential DKK1 expression of hormone-independent tumors ($p=0.005$). This preferential expression was observed mainly in absence of both hormone receptors. Specifically, only 1 of the 5 ER⁻/PR⁺ tumours evaluated was DKK1⁺ (data not shown). Similar results were obtained with the ER⁺/PR⁻ group (1 DKK1⁺ specimen of 8 tested; data not shown).

We also evaluated expression depending on familial history, and 48% of DKK1⁺ tumours arose from women reporting familial cases of breast cancer (Figure 3^{ml}D). When we compared the cohort tested, DKK1 expression was preferentially and significantly expressed in women with familial cases of breast cancer ($p=0.024$). DKK1 was also preferentially detected in primary tumours of patients with a higher number of metastatic axillary lymph nodes, specifically with 10 or more invaded nodes (Figure 3^{ml}E; $p=0.002$). Additionally, a higher proportion of DKK1 positive tumours was found in advanced breast cancer stages (American Joint Committee on Cancer, TNM stage grouping; Figure 3^{ml}F). All tumours from patients with stage IIIC were DKK1⁺ ($p=0.04$), which includes tumours of any size presenting 10 or more metastatic axillary nodes. Finally, although it did not reach statistical significance, DKK1 expression was also documented in some of the most aggressive tumours, namely, in 39% of poorly differentiated histopathological grade 3 tumours, and in 31% of tumours wider than 2 cm in their greatest diameter (data not presented). Furthermore, HER-2/*neu* overexpression was observed in only 1 DKK1-positive tumour. DKK1 expression was found in lobular as well as in ductal carcinomas and was not associated with recurrence. Altogether, cluster analysis revealed significant preferential DKK1 expression in familial and hormone-resistant breast cancers, which also encompassed the most aggressive tumours.

Importantly, DKK1 protein production was evaluated by ELISA in crude extracts prepared from breast cancer clinical specimens. As shown in Figure 3^{ml}G, we detected DKK1 protein in 4 of the 6 RT-PCR/DKK1⁺ samples. The 2 samples in which no DKK1

protein was detected had the lowest level of mRNA (<260 copies). Interestingly, when we evaluated 12 samples that were originally categorized as DKK1⁻ by RT-PCR, 11 were negative for the DKK1 protein and 1 was positive (the mRNA for this sample was prepared from an ER⁻/PR⁻ specimen).

Altogether, these data demonstrate DKK1 production (mRNA and protein) from breast cancer specimens, with a preferential expression pattern in tumours with poor outcomes.

DKK1 is expressed in multiple tumour types

We next evaluated if DKK1 was expressed in tumours of other origins. Interestingly, as seen in Figures 4^{ml}A and 4^{ml}B, DKK1 expression was revealed in cell lines derived from lung cancer (5/5), melanomas (9/11), ovarian cancer (SKOV3), and colon cancer (HCT116). DKK1 was detected in 2 prostate cancer lines known to be hormone-independent (DU145 and PC3), but not in LNCaP, which is hormone-dependent (Figure 4^{ml}B). The latter observation further corroborated previous findings on breast cancers, where DKK1 was preferentially expressed in hormone receptor-negative tumours (Figure 3^{ml} C). Expression of DKK1 in some cancer cell lines was also confirmed by real time RT-PCR (Supplementary data, Figure 2^{ml}). DKK1 protein secretion was evaluated in culture supernatants. As presented in Figure 4C, secretion was confirmed in cancer cell lines derived from the prostate (PC3), colon (HCT116), lung (H460), and 1 melanoma (586mel). Surprisingly, DKK1 was barely detected in 2 other melanoma lines that were positive for mRNA. We further evaluated DKK1 in cell extracts from these 2 melanoma lines, but no protein was detected, excluding the possibility that DKK1 is sequestered inside the cell (data not shown).

Finally, as depicted in Figure 4^mD, expression was evaluated in clinical samples prepared from kidney cancer, and we detected DKK1 at >200 copies/1X10⁵ copies of β -actin in 6 specimens (n=20). In addition, DKK1 was found in 11 out of 23 lung cancer specimens (Figure 4^mE). Altogether, these data suggest that DKK1 is a shared antigen expressed in multiple cancer types.

Discussion

Tumours have an aberrant protein expression profile as a consequence of genomic and proteomic alterations. Frequently, genes specialized in embryonic development are abnormally expressed in tumours. We describe here DKK1 expression in human tumours of various origins, including breasts, lungs and kidneys. Dickkopf-1, which is involved in some aspects of embryonic development, was detected in mature human tissues, mainly in the placenta, an observation reported by Fedi *et al.* (Fedi *et al.*, 1999). Interestingly, by analyzing its expression profile in breast cancer patients, DKK1 appears in tumours with a poor outcome, specifically hormone-independent cases. Also, we reported preferential tumour expression in women with familial cases of the disease. Finally, we observed substantial DKK1 protein secretion in breast cancer lines, which was further confirmed in crude extracts prepared from breast cancer specimens.

In the embryo, DKK1 functions as a secreted protein interfering with the canonical Wnt pathway (Mao *et al.*, 2002). In the absence of DKK1, Wnt interacts with 2 co-receptors, namely, LRP5/6 and Fz, which results in β -catenin accumulation and migration to the nucleus. Consequently, interaction with the transcription factor TCF delivers positive signals for cell proliferation (reviewed in Rothbacher *et al.*, 2002; and Brennan *et al.*, 2004). Interestingly, in 1982, Nusse and Varmus (Nusse *et al.*, 1982) identified the first Wnt gene as being a mammary oncogene, and several members of the Wnt family have been linked to cancer development, especially of the breast (reviewed in (Li *et al.*, 2000)). Surprisingly, low levels of membranous β -catenin expression have been associated with significantly worse outcomes (Dolled-Filhart *et al.*, 2006), which contradicts other studies (Chung *et al.*, 2004; Lin *et al.*, 2000). As such, there is still much debate about the link between tumour aggressiveness and β -catenin expression. Interestingly, DKK1 negatively affects the Wnt pathway. At the adequate time during embryogenesis, DKK1 is secreted and binds to the

LRP5/6 coreceptor (Semenov *et al*, 2001), blocking interaction with secreted Wnt protein, causing β -catenin degradation and stopping TCF-regulated gene expression in the nucleus. This mechanism of DKK1 action is important in limb and head development (Glinka *et al*, 1998; Mukhopadhyay *et al*, 2001). Conversely, inhibition of the Wnt pathway by DKK1 initiates cardiogenesis early in vertebrate embryos (Foley *et al*, 2005; Marvin *et al*, 2001).

Dickkopf-1 has been studied in the context of colon and gastric cancers. In colon cancer, Gonzalez-Sancho *et al*. reported that the loss of DKK1 expression may open the door to cancer by removing the inhibitory effect on the Wnt/ β -catenin pathway (Gonzalez-Sancho *et al*, 2005). DKK1 epigenetic inactivation may be a consequence of CpG methylation (Aguilera *et al*, 2006; Mikata *et al*, 2006). However, hypermethylation has been observed in only 17% of colon cancer clinical specimens, which indicates that this phenomenon is real but cannot be generalized (Aguilera *et al*, 2006). Also, the convincing mechanistic demonstration was performed mostly with cancer cell lines treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and contradicts the fact that DKK1 is secreted by many highly proliferative cancer cell lines (Figures 1^{ml}B, 3^{ml}G and 4^{ml}C) and is detected in many breast, kidney and lung cancer specimens.

Consequently, DKK1 may have either negative or positive consequences on development, depending on time and tissue distribution during embryogenesis. In cancer, DKK1 expression does not apparently alter cell growth, especially since we noted its expression in tumours with poor prognosis. The link between DKK1 and Wnt in the context of cancer progression is plausible and currently under investigation. Previous studies have shown that artificial DKK1 expression in some tumour lines with constitutive activation of the β -catenin pathways resulted in some decrease of cell viability but only in the presence of an oxidative stress inducer (Bafico *et al*, 2004). In cancer cell lines such as MDA231 and HCT116 where β -catenin is up-regulated, the addition of inhibitors of the canonical Wnt pathway (other than DKK1) led to a marked reduction of free β -catenin (Gregorieff *et al*, 2005; Bafico *et al*, 2004). However, according to our findings, these 2 cell lines already

secrete high levels of DKK1 protein, which is known to be an inhibitor of the canonical Wnt pathway. Consequently, none of these *in vitro* studies correlate with the clinical observation we report here, about the presence of DKK1 protein in growing tumours from breast cancer patients. It is too early to speculate as to whether DKK1 plays a role in cancer similar to its known function in normal cells and in embryogenesis. It may be possible that DKK1 overexpression in *in vitro* systems may be masked by its other features when expressed at a physiological level. Still, a high cytoplasmic β -catenin level was found in patients with poor prognosis (Lin *et al*, 2000). DKK1 has been linked to other attributes specific to cancer cells. For example, Hall *et al*. have recently reported that prostate cancer-derived DKK1 is involved in osteoblastic activity in bone metastases (Hall *et al*, 2005).

Dickkopf-1 could also be involved in particular phenotypes of hormone responsive tumours. We observed statistically significant preferential DKK1 expression in hormone receptor-negative (ER⁻/PR⁻) breast tumours (Figure 3^{m1}B and C). DKK1 is regulated by progesterone in normal endometrial stroma cells (Tulac *et al*, 2006), but there is insufficient topical Dickkopf-1 expression in normal tissue for it to be linked to the expression profile reported here in breast cancer. Interestingly, Faivre *et al*. recently reported that the Wnt pathway can be upregulated by the progesterone receptor in breast cancer (Faivre *et al*, 2006). However, it is too soon to establish a link between DKK1 expression and the absence of hormone receptors. In fact, we observed DKK1 in 2 hormone-independent prostate cancer lines (DU45 and PC3; Figure 4^{m1}B) but not in a hormone-dependent tumour (LNCaP). This expression profile is similar to that observed in breast cancer. Finally, we observed co-expression of DKK1 and HER-2/*neu* in breast cancer cells in only 1 of the 21 DKK1⁺ tumours (data not shown). Consequently, only 1 of those tumours would be eligible for treatment with Herceptin®, an antibody interfering with tumour progression. This further emphasizes the necessity of finding additional targets for immunotherapy.

Interestingly, DKK1 could have potential applications as a secreted tumour marker for cancer diagnosis, staging and monitoring of relapse. Additional investigations are

required to establish the feasibility of DKK1 protein detection in different body specimens or fluids.

In conclusion, since DKK1 is specifically expressed in common cancers, and absent from essential normal tissues, this protein is a potential TA for cancer immunotherapy. Its role as an inhibitor of the Wnt canonical pathway in normal cells aside, it may be possible to target DKK1 could be targeted for a cytotoxic response through CD8⁺ T cell recognition as a consequence of internal antigen processing leading to MHC class I presentation. In addition, a humoral response may be involved, since antigen-presenting cells can take up secreted tumour-derived DKK1 and elicit a CD4⁺ helper T lymphocyte response. Importantly, considering that DKK1 is preferentially expressed in tumors from women with a family history, and but absent from important normal tissues, the protein could be targeted in a preventive vaccine for women at risk of developing the condition. Actually, about 70 to 80% of women at high risk for breast cancer are predicted to develop the disease and, presently, with the exception of radical mastectomy, no effective prevention strategies are available.

Acknowledgements

Clinical samples from breast cancer patients were provided by the Breast Cancer Bank from CHUM, a component of the FRSQ Cancer Network, and we kindly thank Urszula Krzemien for the management of clinical samples and databases. We thank Stephanie Fiola for technical support. Some of the clinical samples from lung cancer patients were provided by the Lung Cancer Tissue Library of the FRSQ Respiratory Health Network of Hôpital Laval. The editorial assistance of Ovid Da Silva, Support Office, Research Centre, CHUM, is acknowledged. We thank Dr. Edgar Nassif for critical review of the manuscript. We also thank Robert Boileau for statistical analyses.

Figures and Table

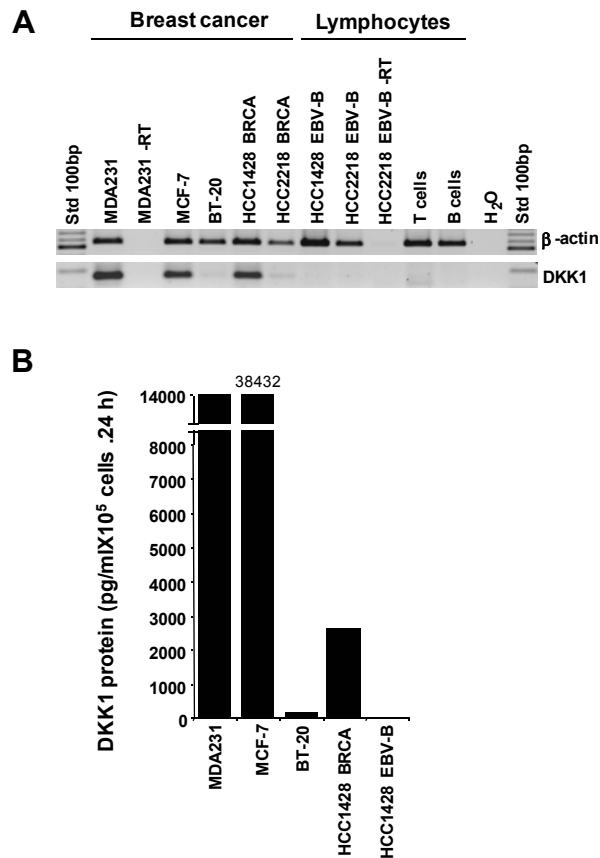


Figure 1^{ml}. Expression profile of genes selected by the bio-informatic approach in tumour cell lines and PBMC

Legend : A - Messenger RNA was prepared from the indicated cell lines, and RT-PCR analyses were performed with the specific primers indicated. Normal primary cell lines were prepared by stimulation of PBMC with anti-CD3 and IL-2 (T cells), or with soluble CD40L and IL-4, which stimulate B lymphocytes to proliferate (B cells). Reverse transcriptase was omitted in the MDA231-RT group and HCC2218 EBV-B cells (EBV-B - RT). HCC2218 EBV-B and HCC1428 EBV-B are EBV-immortalized B lymphocytes

prepared from breast cancer patient HCC2218 and HCC1428 respectively. Amplification was detected by ethidium bromide staining after electrophoresis migration in agarose gel. The results presented are representative of at least 3 independent experiments. **B** - Indicated tumour cell lines were plated for 24 hours in 96-well plates as described in Materials and Methods. Supernatants were harvested, and DKK1 secretion was determined by ELISA. The results presented are an average of at least 2 independent experiments.

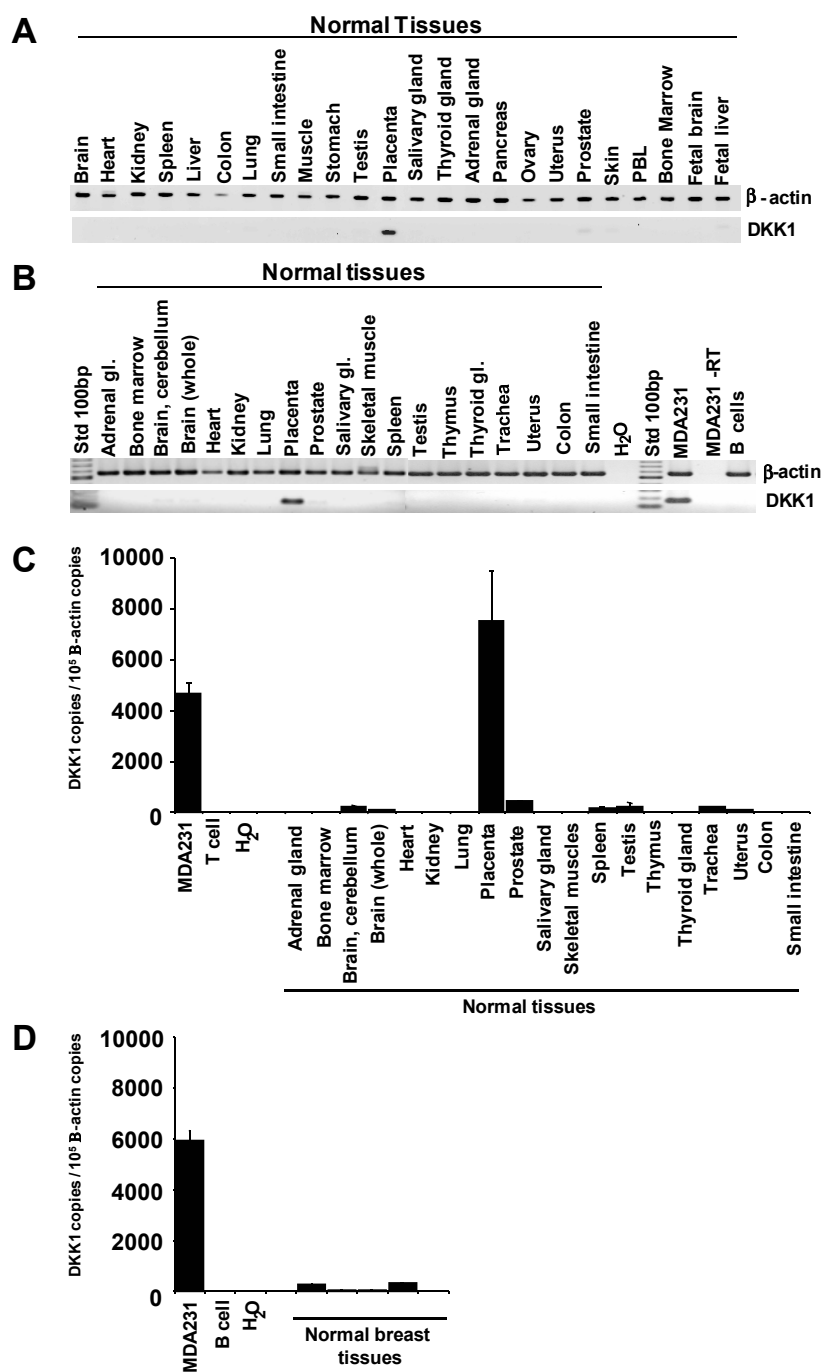


Figure 2^{m1}. Expression profile of DKK1 in normal tissues

Legend : Messenger RNA was prepared from normal tissues (acquired from Origene in **A**, and from BD-Clontech in **B, C and D**) and controls. **A and B** - Semi-quantitative classical RT-PCR analyses were performed with β -actin and primers indicated as described in Materials and Methods. **C** - Expression from normal tissues was evaluated by quantitative real-time RT-PCR. **D**- Expression in normal breast tissues was also evaluated by quantitative real-time RT-PCR. The results presented are representative of at least 2 independent experiments.

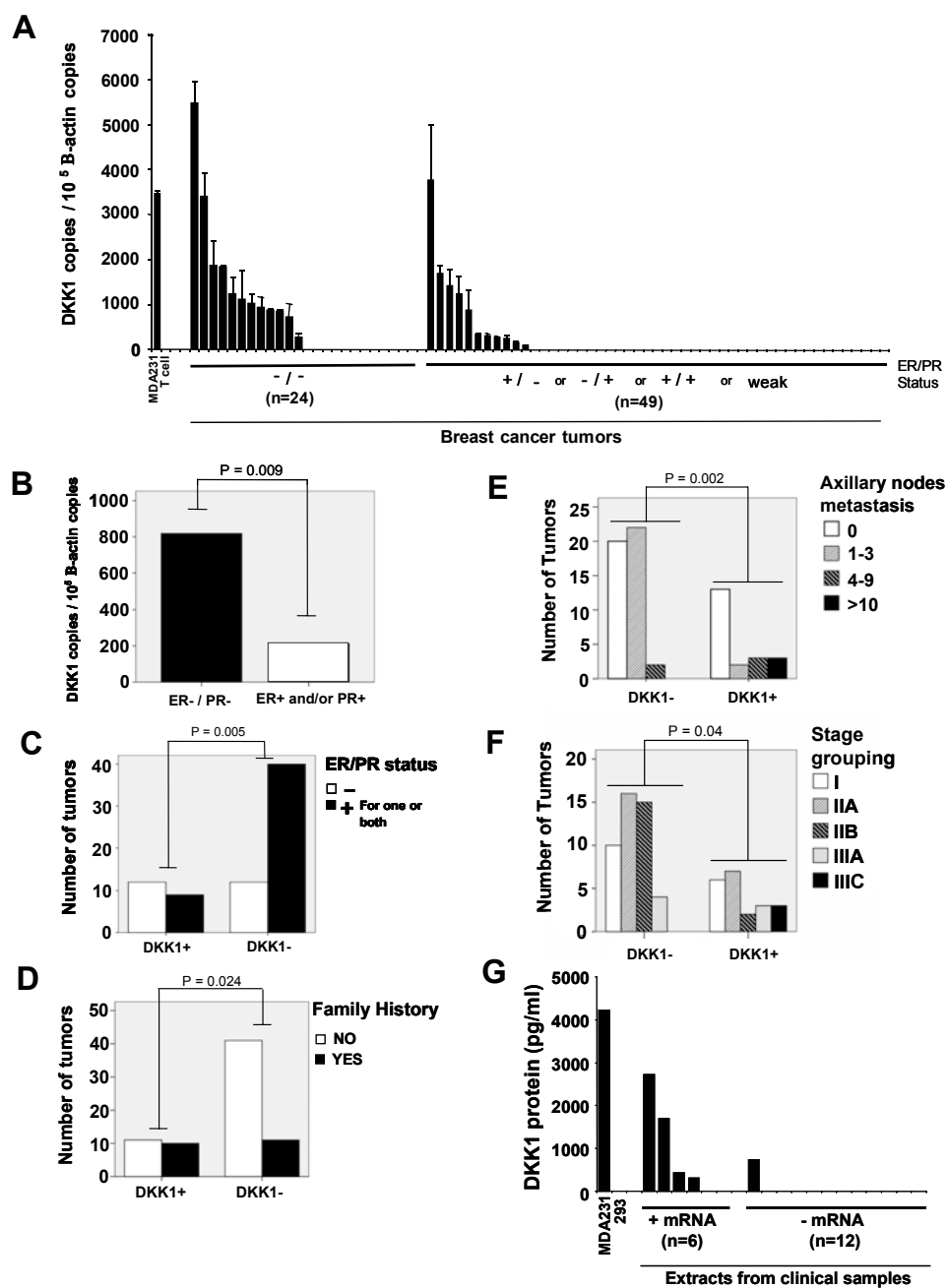


Figure 3^{m1}. DKK1 expression from breast cancer clinical samples

Legend : **A** - cDNA was prepared from the indicated controls and clinical samples. Amplification was undertaken by real-time PCR and revealed by SYBR green staining. Amplification of the relevant amplicon was further confirmed by separation on agarose gel and ethidium bromide staining. **B and C** - Samples from patients are clustered by ER and PR status, as evaluated by the local pathology clinical department (score: -: negative, +: positive, w: weakly positive, NA: not available). DKK1 levels from mRNA-positive tumours were clustered according to ER/PR status; statistical significance was evaluated by t-test (**B**). DKK1⁺ and DKK1⁻ samples were clustered according to ER/PR status; statistical significance was evaluated by the Chi-square test (**C**). **D** - DKK1⁺ and DKK1⁻ samples were clustered according to the reported familial history of breast cancer; statistical significance was evaluated by the Chi-square test. **E** - DKK1⁺ and DKK1⁻ samples were clustered according to the number of metastatic axillary nodes; statistical significance was evaluated by the Chi-square test. **F** - DKK1⁺ and DKK1⁻ samples were clustered according to the tumour stage grouping (AJCC); statistical significance was evaluated by the Chi-square test. **G** - A crude protein extract was prepared from available tumour samples as described in Materials and Methods. DKK1 secretion was determined by ELISA. The results presented are the average of at least 2 independent experiments.

Legend : A and B - Messenger RNA was prepared from the cancer cell lines indicated and RT-PCR analyses were performed with specific primers. Amplification was detected by ethidium bromide staining after electrophoresis migration in agarose gel. **C** – The tumour cell lines indicated were plated for 24 hours in 96-well plates as described in Materials and Methods. Supernatants were harvested, and DKK1 secretion was determined by ELISA. An average of at least 2 independent experiments is presented for each sample. **D and E** - cDNAs were prepared from the indicated controls and clinical samples of kidney (**D**) or lung (**E**) cancers. Amplification was undertaken by real-time PCR and revealed by SYBR green staining. Amplification of the relevant amplicon was further confirmed by separation on agarose gel and ethidium bromide staining. Legend: 293 are HEK-293T human embryonic kidney cells.

Table I. List of overexpressed candidate genes in breast cancer compared to normal tissues, identified by cDNA (EST) and the SAGE DGED from the CGAP server. β -actin and ubiquitin C are referenced as ubiquitously-expressed genes.

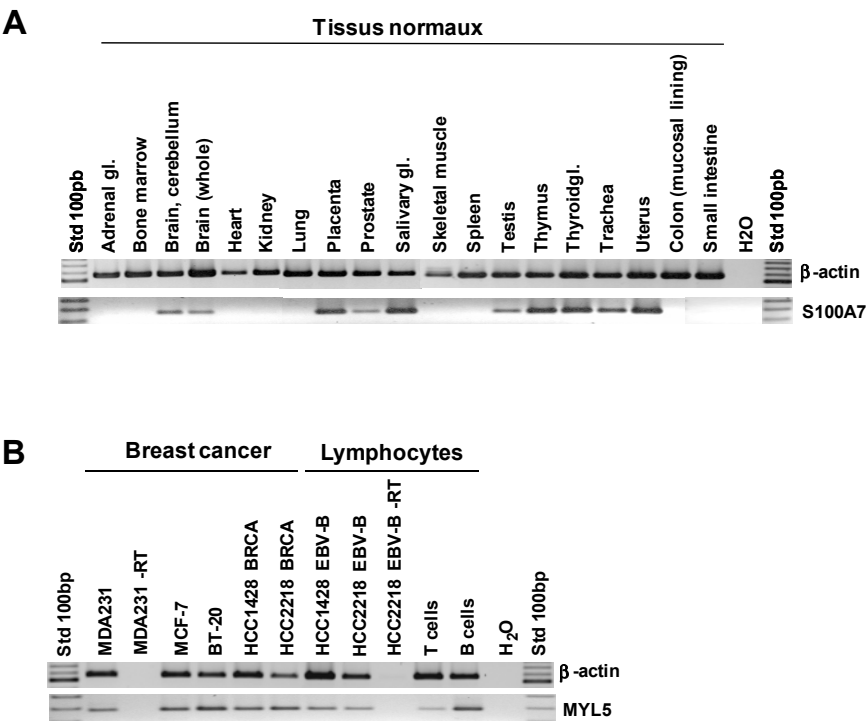
Identification ¹	SAGE ²		EST ²	
	Normal	Cancer ³	Normal	Cancer ³
Hs.288061 β -Actin	1104	713	1423	2985
Hs.183704 Ubiquitin C	501	366	356	241
Hs.180142 Calmodulin-like skin protein (CLSP)	11	<u>126</u>	0	<u>144</u>
Hs.79414 Prostate Ets transcription factor (PDEF)	45	<u>545</u>	219	<u>4205</u>
Hs.112408 S100 calcium-binding protein A7 (S100A7)	17	<u>1088</u>	0	0
Hs.130239	0	<u>24</u>	0	48
Hs.144479	0	<u>33</u>	0	0
Hs.350570 Dermcidin (DCD)	0	<u>565</u>	0	0
EST 602281305F1 (SAGE tag TTCGGTTGGT) ⁴	+	++++	NA	NA
Hs.199713	0	<u>268</u>	0	32
Hs.40499 Dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1 (DKK1)	17	<u>304</u>	137	0
Hs.46452 Mammaglobin 1	39	33	0	<u>273</u>
Hs.215937	0	0	55	<u>369</u>
Hs.170482 Myosin, light polypeptide 5 (MYL5)	11	0	82	<u>2006</u>
Hs.1852	39	29	0	<u>1332</u>

Supplementary data Table I^{m1}

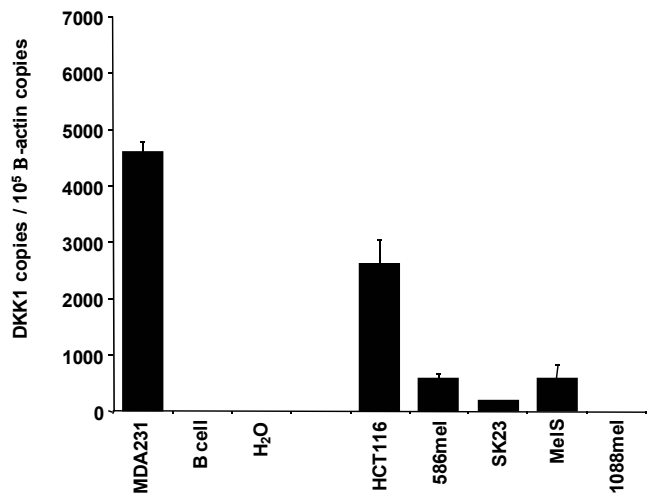
Legend : ¹ - Unigene ID and names when available; ² - Number of positive sequences from libraries prepared from breast tumours or selected normal tissues, among all available tags or sequences. Values are reported as number of positives/1 X 10⁶ sequences; NA: not available; ³ - Numbers are bolded and underlined when p<0.05 and 5 times the value from normal cells; ⁴ - No assigned Unigene ID (EST prepared from osteocarcinoma). The expression level is subjectively reported from 0 to +++++.

We highlighted genes overexpressed in breast cancers compared to libraries prepared from a wide array of normal tissues. β -actin and ubiquitin C genes were included as positive controls, and, as expected, the reported expression levels were relatively equivalent in the

normal and tumour tissues selected. Also, we excluded several candidates found uniquely in libraries prepared from cultured cell lines (all genes identified by Hs, and EST 602281305F1; Table I).



Supplementary data Figure 1^{m1}



Supplementary data Figure 2^{m1}

References

- Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, García JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM (2006) Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 25: 4116 – 4121
- Bafico A, Liu G, Goldin L, Harris V, Aaronson SA (2004) An autocrine mechanism for constitutive Wnt pathway activation in human cancer cells. *Cancer Cell* 6: 497 - 506
- Brennan KR, Brown AM (2004) Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mamm Gland Biol Neoplasia* 9: 119 - 131
- Chung GG, Zerkowski MP, Ocal IT, Dolled-Filhart M, Kang JY, Psyrri A, Camp RL, Rimm DL (2004) beta-Catenin and p53 analyses of a breast carcinoma tissue microarray. *Cancer* 100: 2084 - 2092
- Dolled-Filhart M, McCabe A, Giltnane J, Cregger M, Camp RL, Rimm DL. (2006) Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome. *Can Res* 66: 5487 - 5494
- Faivre EJ, Lange CA (2006) Progesterone receptors upregulate Wnt-1 to induce epidermal growth factor receptor transactivation and c-Src-dependent sustained activation of Erk1/2 mitogen-activated protein kinase in breast cancer cells. *Mol Cell Biol* Oct 30; [Epub ahead of print]
- Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, Kraus MH, Aaronson SA (1999) Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem* 274: 19465 - 19472
- Foley AC, Mercola M (2005) Heart induction by Wnt antagonists depends on the homeodomain transcription factor Hex. *Genes Dev* 19: 387 - 396
- Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391: 357 - 362
- González-Sancho JM, Aguilera O, García JM, Pendás-Franco N, Peña C, Cal S, García de Herreros A, Bonilla F, Muñoz A (2005) The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24: 1098 - 1103
- Görög D, Regöly-Mérei J, Paku S, Kopper L, Nagy P (2005) Alpha-fetoprotein expression is a potential prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *World J Gastro* 11: 5015 - 5018

- Gregorieff A, Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* **19**: 877 - 890
- Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET (2005) Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Can Res* **65**: 7554 - 7560
- Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P (2003) CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Can Res* **63**: 2836 - 2843
- Li Y, Hively WP, Varmus HE (2000) Use of MMTV-Wnt-1 transgenic mice for studying the genetic basis of breast cancer. *Oncogene* **19**: 1002 - 1009
- Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC (2000) Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4262 - 4266
- Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM, Delius H, Hoppe D, Stannek P, Walter C, Glinka A, Niehrs C (2002) Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**: 664 - 667
- Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB (2001) Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev* **15**: 316 - 327
- Mikata R, Yokosuka O, Fukai K, Imazeki F, Arai M, Tada M, Kurihara T, Zhang K, Kanda T, Saisho H (2006) Analysis of genes upregulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine in gastric cancer cell lines. *Int J Cancer* **119**: 1616 - 1622
- Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-Esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, Dorward DW, Glinka A, Grinberg A, Huang SP, Niehrs C, Izpisua Belmonte JC, Westphal H (2001) Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Dev Cell* **4**: 423 - 434
- Nusse R, Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* **31**: 99 - 109
- Rothbacher U, Lemaire P (2002) Crème de la Kremen of Wnt signalling inhibition. *Nat Cell Biol* **4**: E172 - E173
- Seménov MV, Tamai K, Brott BK, Kühl M, Sokol S, He X (2001) Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol* **11**: 951 - 961
- Strausberg RL, Buetow KH, Emmert-Buck MR, Klausner RD (2000) The cancer genome anatomy project: building an annotated gene index. *Trends Genet* **16**: 103 - 106

Taketa K (1990) Alpha-fetoprotein: reevaluation in hepatology. *Hepatology* 12: 1420 – 1432

Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr (2003) The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 349: 2483 - 2494

Tulac S, Overgaard MT, Hamilton AE, Jumbe NL, Suchanek E, Giudice LC (2006) Dickkopf-1, an inhibitor of Wnt signaling, is regulated by progesterone in human endometrial stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1453 - 1461

Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kühne T, Goodyer CG, Albrecht S, Von Schweinitz D, Pietsch T (2003) Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wntless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors. *Lab Invest* 83: 429 - 434

SECTION 3. MANUSCRIT 2

Polyfunctionality of a DKK1 self-antigen-specific CD8⁺ T lymphocyte clone in lung cancer

Article soumis (seconde fois) pour publication à : *Cancer Immunology, Immunotherapy* (2 mai 2011)

Marie-Andrée Forget¹, Alexandre Reuben¹, Simon Turcotte¹, Jocelyne Martin² and Réjean Lapointe^{1*}

¹ Centre de Recherche, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) – Hôpital Notre-Dame, Département de médecine, Université de Montréal, et Institut du cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

² Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM) - Hôpital Notre-Dame, Department of Surgery, , Division of Thoracic Surgery, Québec, Canada

Running title: Polyfunctionality of an anti-DKK1 T cell

Key words : Dickkopf-1 (DKK1); polyfunctionality; lung cancer; CD8⁺ T lymphocyte

M.-A. Forget est responsable de la majorité de la réalisation des travaux de recherche et de la rédaction de cet article. A.Reuben et. S.Turcotte ont apporté une contribution critique. J. Martin a contribué à l'obtention des échantillons cliniques utilisés pour les travaux de recherche. R. Lapointe a supervisé l'ensemble de l'étude.

Abstract

Polyfunctionality is the capacity of a T cell to execute a variety of effector functions mainly mediated by production of cytokines, chemokines and cytolytic enzymes. Studies in anti-viral immunity have acknowledged the importance of polyfunctionality in the clearance of infections and maintenance of protection. Although accepted in the field, this concept has not been as well characterized in cancer immunology. Here, we report the polyfunctionality profile analysis of a CD8⁺ T cell clone isolated from a lung cancer patient and directed against Dickkopf-1 (DKK1), a potentially new tumor-associated antigen (TAA). The clone showed Tc1/Th1 effector tendencies confirmed by secretion of cytokines such as IFN- γ , IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α , IL-2, GM-CSF and expression of cytolytic enzyme granzyme B. This secretion profile is of particular interest in the context of an anti-tumor response. Although secretion of IL-5 and IL-13 was also detected, absence of IL-4 and IL-10 opposes the idea of cytokine-dependent Th1 inhibition. Establishing a comprehensive cytokine secretion profile may help predict T cells' specific response against a novel TAA in a peptide vaccination context. It may further help in selecting clones with an optimal functional profile from the peripheral blood of cancer patients for expansion and adoptive cell transfer therapy.

Abbreviations:

DKK1: Dickkopf-1

GM-CSF: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor

HLA: Human leukocyte antigen

IFN: Interferon

IL: Interleukin

IP-10: Interferon inducible protein 10

MHC: Major histocompatibility complex

MIP-1: Macrophage inflammatory protein

PBMC: Peripheral blood mononuclear cells

TAA: Tumor-associated antigen

TNF: Tumor necrosis factor

Introduction

In recent years, advances in polychromatic flow cytometry have birthed one of the greatest developments in the search to fully characterize the diversity of T cell immune responses in a multiparameter manner [1]. From this technology has emerged the concept of polyfunctionality. Polyfunctionality represents the capacity of a single T cell to perform a variety of effector functions mainly mediated by cytokines, chemokines and cytolytic enzymes. Virology studies have acknowledged the importance of polyfunctionality in the clearance of infections and maintenance of protection; the vaccinia virus model which identified T cells presenting multiple functions (IFN- γ , MIP-1 β , TNF- α and +/-IL-2) and contributing to antiviral effective responses [2] illustrates the importance of polyfunctionality in fighting infection. The live attenuated yellow fever vaccine is another example linking polyfunctionality to quality of the immune response. The use of multiparameter flow cytometry in combination with multiplex cytokine analysis has further helped paint a better defined portrait of the immune response conferred by this vaccine and its prolonged protection [3].

To date, polyfunctionality has not been well characterized in cancer immunology. Immune monitoring after vaccination has relied solely on IFN- γ secretion. Recently, using a mouse model, Imai *et al.* demonstrated the importance of characterizing T cell functions in adoptive cell transfer (ACT) to better understand disease outcome [4, 5]. Although the interest of this study was evident, looking beyond three or four T cell functions could prove more informative.

Recently, we and others have reported the expression of Dickkopf-1 (DKK1), a Wnt pathway inhibitor, in various common cancers with expression levels correlating positively with a bad prognosis in lung cancer [6-9]. In multiple myeloma, DKK1 has been proposed as a tumor-associated antigen (TAA) with the identification of a highly immunogenic peptide and demonstration of lytic capacity of DKK1-specific T cells [10]. To combine the

need to transpose such beneficial potential to lung cancer and to learn more about the polyfunctionality of DKK1-specific T lymphocytes, we expanded a T cell clone specifically recognizing this DKK1 peptide and characterized its immune functions by combining multiplex cytokine analysis and flow cytometry. To our knowledge, this represents the first study reporting such complete polyfunctional profiling of a T cell clone specific to a candidate TAA and may prove useful in cancer immunotherapy of solid tumors.

Materials and Methods

*DKK1 HLA-A*0201 peptide selection*

DKK1 full sequence was analyzed to predict HLA-A*0201-binding epitopes using Dr. Kenneth C. Parker's and SYFPEITHI's algorithms as well as PProC for prediction of proteasomal cleavage [11-13]. Decamer and nanomer peptides were synthesized at the Service de Synthèse de Peptides de l'Est du Québec (Centre Hospitalier de l'Université Laval, Québec, QC, Canada).

Cell line

The lymphoblast T2 cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, VA). T2 were cultured in RPMI 1640 supplemented with foetal bovine serum (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 g/mL gentamycin (Wisent).

MHC class I stabilization assay

MHC class I stabilization assay was performed as described previously [14] using decreased peptide concentration (10 μ M). Briefly, HLA-A*0201-FITC antibody (One Lambda, CA) was used to quantify surface HLA-A*0201 expression by flow cytometry on an LSR II (BD Bioscience, Mississauga, ON, Canada). The geometrical mean fluorescence intensity (MFI) of unpulsed T2 was subtracted from the peptide-pulsed T2 MFI to obtain delta MFI.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC), Expansion of DKK1-specific T lymphocyte lines and Clone isolation

PBMC were obtained from lung cancer patients recruited at the CHUM Notre-Dame Hospital. Blood was drawn preceding surgery. All subjects signed an informed consent form and the project was reviewed and approved by the local ethics committee.

PBMC from lung cancer patients were prepared from whole blood using lymphocyte separation medium (Wisent). Freshly isolated PBMC were cultured with 50 μ M of DKK1 peptide in Iscove's modified Dulbecco's complete medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 7.5% human AB serum (Gemini Bio-Products, Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin/streptomycin and 10 g/mL gentamycin (Wisent) for 10^6 cells/mL. Cultured PBMC were restimulated 7 days later with autologous peptide-pulsed CD40L-activated B lymphocytes generated as previously described [15] and supplemented with 500 ng/mL CD40L (Immunex Corporation, Seattle, WA). One day after restimulation and every 4 to 5 days later, 60 U/mL of IL-2 and 5 ng/mL of IL-7 and IL-15 (Peprotech, Rocky Hill, NJ) were added. T cell specificity was assessed on day 20-21 on the basis of IFN- γ cytokine secretion by ELISpot assay performed with a commercially available human IFN- γ ELISpot kit (Abcam, Cambridge, MA). Peptide-pulsed T2 cells were used as target cells. Wells displaying 10 or more spots and double the mock peptide were considered positive for peptide recognition. Specific T cells were then cloned by limiting dilution and cultured as previously described [16]. Clones' specificity was assessed approximately two weeks later on the basis of IFN- γ cytokine secretion by ELISA assay, using peptide-pulsed T2 as target. Secretion was considered positive and specific when >50 pg/mL secreted and double the value of the negative control. Peptide-specific clones were then amplified by rapid expansion protocol [16].

Multiplex cytokine analysis and Flow cytometry

T cell supernatant from ELISA assay was tested for the presence of a 27 cytokine array by Bio-Plex® (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Secretion was considered positive and specific when >50 pg/mL and double the value of the negative control.

T cells were stained with the following antibodies: anti-CD3 Alexa 700, anti-CD8 Pacific Blue (BD Bioscience) and anti-granzyme B allophycocyanine (Invitrogen). For all fluorochromes, matching isotype antibodies were included as negative controls. Intracellular staining was performed with the FoxP3 staining buffer set (eBioscience, San Diego, CA, USA). Flow cytometry was performed on an LSR II (BD Biosciences).

Results

Selection of DKK1 peptides

For peptide selection, DKK1 complete sequence was analyzed using Dr. Kenneth C. Parker's and SYFPEITHI's algorithms for prediction of HLA-A*0201-binding epitopes. Peptides scoring well with at least one algorithm were synthesized in decamers and nanomers to respect MHC class I peptide groove capacity. The peptide list presented in Table I was further validated for proteasomal cleavage by PProC algorithm. Peptides' predicted capacity for HLA-A*0201 binding was confirmed by MHC class I stabilization assay, using T2 cells pulsed with either DKK1 peptides or defined HLA-A*0201 peptides as positive controls. Controls included the M1⁵⁸⁻⁶⁶ peptide from influenza virus and the TAA HER-2/*neu*³⁶⁹⁻³⁷⁷ WT peptide and its mutant, the S5K peptide modified by replacement of the OH on Ser 5 with an aminopropyl. DKK1 peptide 20 showed a delta MFI higher than both HER-2/*neu* 369-377 WT and mutated peptides (Table I and Online resource 1^{m2}). Surprisingly, no other DKK1 peptide caused such significant MHC class I surface stabilization (Table I).

Expansion of CD8⁺ T cell lines and clones directed against DKK1 peptide 20 in a lung cancer patient

To generate DKK1 peptide-specific CD8⁺ T cell lines, PBMC from lung cancer patients were cultured with high doses of selected DKK1 peptides and restimulated a week later with peptide-pulsed autologous CD40L-activated B lymphocytes. Because TAA are weak immunogens, we used high doses of peptide for expansion, but the expanded T cells recognized T2 cells pulsed with peptides at concentrations at least 100 times lower (data not shown). Two weeks later, T cell line specificity was determined by IFN- γ ELISpot assay. DKK1-specific T cell lines were identified for peptides 20 (Online resource 2^{m2}), 36

and 182 (data not shown). However, we succeeded only in expanding T cell clones specific to peptide 20. As shown in Figure 1^{m2}A (left), the CD8⁺ T cell clone specifically secreted IFN- γ in the presence of peptide 20-pulsed T2. Peptide 20 reactivity was maintained after rapid expansion protocol (REP) (Figure 1^{m2}A, right).

Polyfunctionality of a DKK1-specific T cell clone

A previous study in multiple myeloma reported a Tc1/Th1 phenotype for CD8⁺ T cell clones directed against DKK1 peptide 20, based on secretion of IFN- γ and very limited amounts of IL-4 [10]. These two cytokines have traditionally been associated to Th1 and Th2 responses, respectively. However, in line with the concept of polyfunctionality, the potentially significant importance of other cytokines in the immune response has been neglected. Accordingly, we tested the supernatant collected for the same ELISA assay performed after cloning of peptide 20-specific T cells (Figure 1^{m2}A, left) by multiplex cytokine analysis. Of the 27 cytokines and chemokines tested, IP-10, MIP-1 β , IL-2, GM-CSF and MIP-1 α were prominently secreted (Figure 1^{m2}B). RANTES was also secreted (data not shown) but limiting amounts of supernatant prevented us from determining the precise level of secretion. In addition, our clone was positive for granzyme B (Figure 1C). Taken together, these data confirm that the peptide 20 T cell clone mainly presents a Th1 profile. Although significant amounts of IL-5 and IL-13 were also detected, the absence of IL-4 and IL-10 production, both typical Th2 cytokines, opposes the idea of cytokine-dependent Th1 inhibition (Figure 1^{m2}B). Moreover, this immunodominant DKK1-peptide did not induce proliferation of T cells presenting a regulatory profile.

Discussion

T lymphocyte polyfunctionality has proven important in linking the quality of an immune response and clinical outcome. Moreover, T cell polyfunctionality dictates not only the quality of the cell-specific immune response but also hints to the array of immune cell populations recruited to the inflammatory site and to the quality of their coordinated response.

In the present study, we defined the polyfunctionality portrait of a CD8⁺ T lymphocyte clone directed against what appears to be the most immunogenic peptide of DKK1. DKK1 is overexpressed at the protein level in a number of solid tumors and absent in normal tissues, with the exception of the placenta and is thus regarded as a potentially valid TAA. Our work shows that DKK1 peptide 20-specific T cell clones secrete Tc1/Th1 cytokines and chemokines such as IFN- γ , IP-10, MIP-1 β , IL-2, GM-CSF and MIP-1 α as well as cytotoxic enzyme granzyme B. In an anti-tumor context, these factors confer relevant functions. IP-10 is a chemokine capable of attracting other immune cells to the tumor site as do MIP-1 β and MIP-1 α , but is also an angiostatic factor preventing tumor growth and spontaneous metastasis in non-small cell lung cancer [17-19]. GM-CSF remains a great asset in cancer immunotherapy because of its involvement in improving MHC class I presentation by dendritic cells and macrophages and its relevance in lung cancer immunotherapy has been demonstrated [20, 21]. By secreting IL-2 and IFN- γ , our clone distinguished itself from the late memory T cells described by Komanduri's group whose cells were skewed towards MIP-1 β production and did not appear to provide optimal protection from viral infection [22]. The DKK1-specific clone we isolated also secreted IL-13 and weaker levels of IL-5, both Th2 cytokines which may dampen anti-tumor responses. IL-13 produced by CD4⁺ T cells was reported to facilitate cancer development, notably in breast cancer [23]. It is unclear whether IL-5 has a comparable pro-tumor effect but it may be involved in recruitment of eosinophils at the tumor site when secreted by tumor cells

[24]. However, a recent study by Kyte *et al.* uncovered an unusual population of memory T cells secreting IFN- γ , IL-13 and IL-5 which were IL-4- and IL-10-negative. These T cells were found in long-term cancer survivors following peptide vaccination with K-ras, transforming growth factor receptor 2 (TGF- β RII) and the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) antigens [25] and are proof of the plasticity of the human Th1/Th2 response.

Although such a study cannot decipher any direct mechanism, we speculate that it may help to predict the T cells' specific response against a novel TAA in the context of peptide vaccination or in helping in the selection of clones with the best functional profile from the peripheral blood of cancer patients, which can be further expanded and used for adoptive cell transfer therapy. Additional correlation between cytokine expression profile and the differentiation level of antigen-specific T cells may help distinguish exhausted cells from effector memory-specific T cells, and provide further insights into the effectiveness of vaccination strategies or into the selection of cells for therapy.

Acknowledgements

Clinical samples from breast cancer patients were provided by the Breast Cancer Bank from CHUM, a component of the FRSQ Cancer Network, and we kindly thank Urszula Krzemien for the management of clinical samples and databases.

Figures and Table

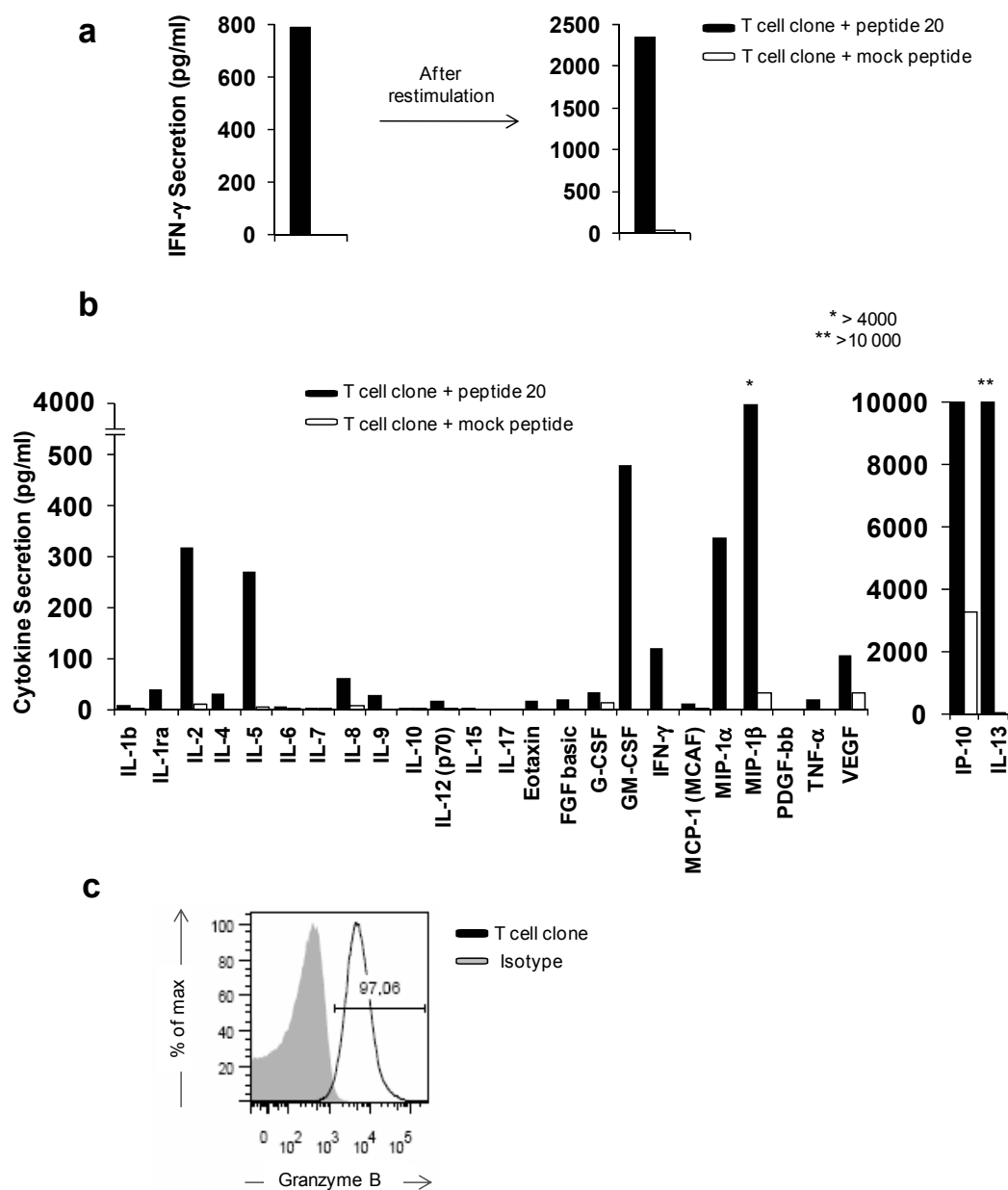


Figure 1^{m2}. Cytokine secretion profile of a CD8⁺ T lymphocyte clone specific for DKK1 20-29, expanded from a lung cancer patient's PBMC

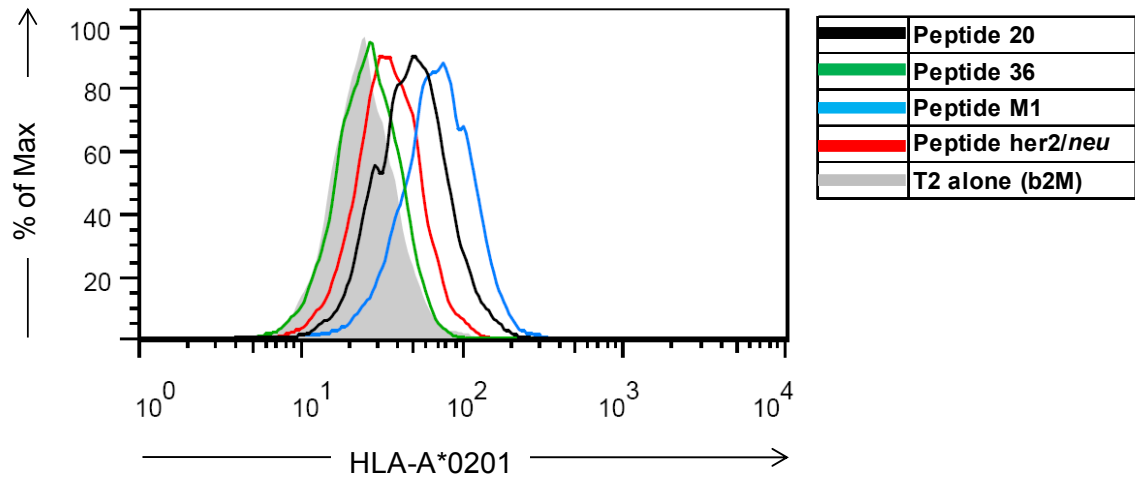
Legend : **a)** Levels of IFN- γ secreted by freshly-isolated DKK1 T cell clone specifically recognizing peptide 20-pulsed T2 cells (left). The T cell clone was isolated by limiting dilutions and IFN- γ was measured by ELISA assay. Secretion was considered positive above 50 pg/mL and double that of the negative control (irrelevant peptide). Specificity of the clone was maintained after being subjected to a rapid expansion protocol (right). **b)** Supernatant obtained in **a)** (left) was evaluated by multiplex cytokine analysis for production of 27 cytokines. Again, secretion was considered positive above 50 pg/mL secretion and double that of the negative control. **c)** T cell clone expanded by rapid expansion protocol (**a**), right) was stained intracellularly for granzyme B or isotype control for background.

Table 1 Algorithm-Predicted and Flow Cytometry-Quantified HLA-A*0201 Binding Capacity of Selected DKK1 Peptides

DKK1 peptides				
Peptide _a	Sequence	Parker Rank _b	SYFPEITHI Rank _c	Δ MFI (A*0201) _d
20	ALGGHPLLGV	1	1	22,7
36	VLNSNAIKNL	2	2	1,3
11	RVFVAMVAAA	7	14	NA
18	AAALGGHPLL	28	7	NA
40	NAIKNLPPPL	29	12	4,8
182	KGQEGSVCL	8	20	0,5
25	PLLGVSATL	11	1	NA
52	AAGHPGSAV	14	15	6,7
246	RIQDHHQA	17	43	-0,5
191	RSSDCASGL	20	56	1,2
37	LNSNAIKNL	21	29	0,6
68	YPGGNKYQT	27	89	-0,7
32	TLNSVLNSN	30	15	2,1
61	SAAPGILYP	>50	18	0,2
58	SAVSAAPGI	31	26	2,6
Control peptides				
Peptide	Sequence	Parker Rank _b	SYFPEITHI Rank _c	Δ MFI (A*0201) _d
Her-369	KIFGSLAFL	2	2	9,7
Her-369/S5K	KIFGKLAFL	2	2	16,1
Flu M1-58	GILGFVFTL	2	1	42,7

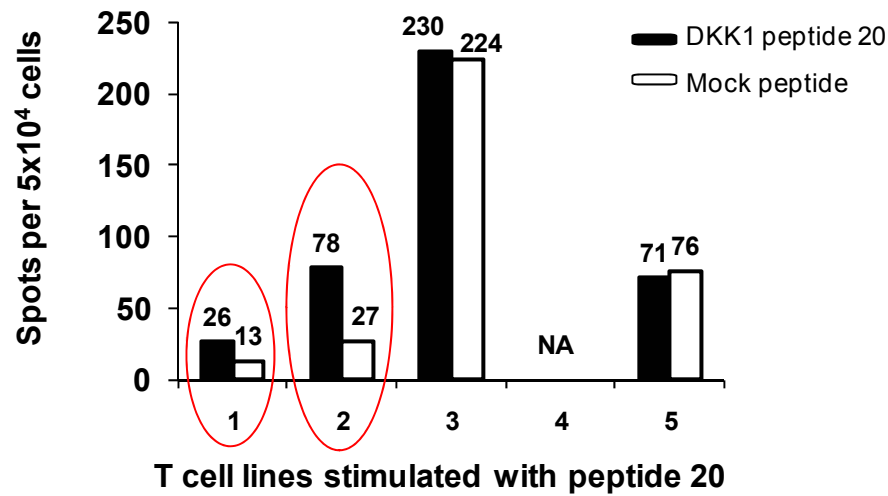
Table I^{m2}

Legend : ^a – Starting position of peptide in DKK1 protein sequence. ^b – Score ranking according to predicted half-time of dissociation from HLA-A*0201 molecules from the BioInformatics & Molecular Analysis Section (BIMAS) server, based on Dr. Kenneth Parker's work. ^c – Score ranking according to peptide binding capacity to HLA-A*0201 molecules, from the SYFPEITHI server, based on Dr. Hans-Georg Rammensee's work. Only peptides that were predicted to be generated by the human proteasome, as approximated by PAMProC tool, were selected. ^d – Delta MFI obtained by flow cytometry analysis following MHC class I stabilization assay. NA– Non-available



Online resource 1^{m2}. DKK1 peptides' binding capacity to HLA-A*0201 molecule

Legend : MHC class I stabilization assay was performed with DKK1 peptide-pulsed T2 and other well described HLA-A*0201 peptides (M1 and HER-2/*neu* WT/mutant) as controls. Surface expression of HLA-A*0201 molecule was quantified by flow cytometry. Presented are DKK1 peptides 20-29 and 36-45 which scored first and second, respectively, with both algorithms used for peptide binding prediction.



Online resource 2^{m2}. Expansion of T lymphocytes specific for DKK peptide 20-29

Legend : PBMC from a lung cancer patient were co-cultured in quintuplicate in presence of peptide 20-pulsed autologous CD40-B cells. Specificity of expanded T cell lines was evaluated by IFN- γ ELISPOT. T cell lines were scored positive when above 10 spots per well and double that obtained with mock peptide-pulsed T2 cells.

References

1. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Roederer M (2004) Seventeen-colour flow cytometry: Unravelling the immune system. *Nat Rev Immunol*.4(8):648-55.
2. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, et al. (2007) Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive cd8(+) t cell responses. *The Journal of experimental medicine*.204:1405-16.
3. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, et al. (2008) Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med*.205(13):3119-31.
4. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Shiku H (2009) Tumor progression inhibits the induction of multifunctionality in adoptively transferred tumor-specific cd8+ t cells. *Eur J Immunol*.39(1):241-53.
5. Imai N, Ikeda H, Tawara I, Wang L, Nishikawa H, Kato T, Shiku H (2009) Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor stimulation enhances the multifunctionality of adoptively transferred tumor antigen-specific cd8+ t cells with tumor regression. *Cancer Sci*.100(7):1317-25.
6. Forget M-A, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, Lapointe R (2007) The wnt pathway regulator dkk1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer*.96:646-53.
7. Makino T, Yamasaki M, Takemasa I, Takeno A (2009) Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*.1:2058-64.
8. Yu B, Yang X, Xu Y, et al. (2009) Elevated expression of dkk1 is associated with cytoplasmic / nuclear b-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas q. *J Hepatol*.50:948-57.
9. Yamabuki T, Takano A, Hayama S, et al. (2007) Dickkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res*:2517-25.
10. Qian J, Xie J, Hong S, et al. (2007) Dickkopf-1 (dkk1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood*.110:1587-94.

11. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE (1994) Scheme for ranking potential hla-a2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol.*152(1):163-75.
12. Syfpeithi: Database for mhc ligands and peptide motifs [database on the Internet]. Immunogenetics 1999. Available from: www.syfpeithi.de.
13. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderer KP (2000) An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol.*298(3):417-29.
14. Zhou M, Xu D, Li X, et al. (2006) Screening and identification of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus-specific ctl epitopes. *J Immunol.*177(4):2138-45.
15. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P (2003) Cd40-stimulated b lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific t cells. *Cancer Res.*63:2836–43.
16. Dudley ME, Nishimura MI, Holt AK, Rosenberg SA (1999) Antitumor immunization with a minimal peptide epitope (g9-209-2m) leads to a functionally heterogeneous ctl response. *J Immunother.*22(4):288-98.
17. Douglas A. Arenberg SLK, Peter J. Polverini, Susan B. Morris, Marie D. Burdick, Mary C. Glass, Dennis T. Taub, Mark D. Iannettoni, Richard I. Whyte, and Robert M. Strieter (1996) Interferon-g-inducible protein 10 (ip-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (nsccl) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med.*184:981-92.
18. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, McKee M, Gajewski TF (2009) Chemokine expression in melanoma metastases associated with cd8+ t-cell recruitment. *Cancer Res.*69(7):3077-85.
19. Nakano A, Yoneyama H, Ueha S, Kitabatake M, Ishikawa S, Kawase I, Sugiyama H, Matsushima K (2007) Intravenous administration of mip-1alpha with intra-tumor injection of p. Acnes shows potent anti-tumor effect. *Int Immunopharmacol.*7(6):845-57.
20. Salgia R, Lynch T, Skarin A, et al. (2003) Vaccination with irradiated autologous tumor cells engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments antitumor immunity in some patients with metastatic non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol.*21(4):624-30.

21. Nemunaitis J, Jahan T, Ross H, et al. (2006) Phase 1/2 trial of autologous tumor mixed with an allogeneic gvax vaccine in advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.*13(6):555-62.
22. Kim TK, St John LS, Wieder ED, Khalili J, Ma Q, Komanduri KV (2009) Human late memory cd8+ t cells have a distinct cytokine signature characterized by cc chemokine production without il-2 production. *J Immunol.*183(10):6167-74.
23. Aspod C, Pedroza-Gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, Marches F, Banchereau J, Palucka AK (2007) Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting cd4+ t cells that facilitate tumor development. *J Exp Med.*204(5):1037-47.
24. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Karabela SP, et al. (2010) Host-derived interleukin-5 promotes adenocarcinoma-induced malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med.*182(10):1273-81.
25. Kyte JA, Trachsel S, Risberg B, thor Straten P, Lislerud K, Gaudernack G (2009) Unconventional cytokine profiles and development of t cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother.*58(10):1609-26.

SECTION 4. RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

Étude des effets phénotypiques et fonctionnels de la modulation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T CD8⁺

Cette partie contient des résultats qui n'ont pas encore été soumis pour publication. Elle concerne des résultats préliminaires de cultures de lymphocytes T CD8⁺ combinées à un traitement ayant pour but l'activation de la voie de Wnt. Suite à ce traitement, différentes analyses multiparamétriques par cytométrie en flux ont été effectuées afin d'évaluer l'impact sur les lymphocytes. Nous avons jugé pertinent de présenter ces résultats, car il s'agit de la première étude de ce genre réalisée chez l'humain. La méthodologie employée est également très intéressante et complexe. La complexité réside, entre autre, dans la culture primaire de lymphocytes T ayant infiltrés les tumeurs ainsi que dans la réalisation d'analyse par cytométrie en flux multiparamétrique. De plus, ces résultats complémentaires s'intègrent bien dans un contexte d'amélioration de l'immunothérapie du cancer par une réponse à médiation cellulaire. L'introduction et la recension de la littérature liées à ce sujet sont présentées dans la Section 1 – Introduction et Section 5 – Discussion, Perspectives et Conclusions.

4.1 Justification

L'immunothérapie par transfert adoptif de lymphocytes T cultivés *in vitro*, ayant été préalablement génétiquement modifiés ou non, a jusqu'ici montré des résultats plus qu'intéressants (229, 240). Cependant, il réside encore différents obstacles à surmonter. Parmi ces défis, on retrouve celui de "la quête" du profil de T CD8⁺ présentant les caractéristiques fonctionnelles optimales pour ce type de traitement. Certains groupes préconisent l'utilisation de lymphocytes T mémoires centraux (T_{CM}), soulignant qu'un trait important que doit posséder un T CD8⁺ en transfert adoptif est sa persistance à long terme (294). Une autre approche consiste à favoriser une réponse immunitaire plus forte suivant le transfert adoptif, favorisant ainsi l'utilisation des lymphocytes T naïfs (T_N) (299, 300). Malgré ces divergences d'opinion, tous convergent vers une même conclusion soit l'utilisation de cellules T moins différenciées pour un transfert adoptif plus efficace. Pour se faire, il serait souhaitable d'utiliser l'IL-15 et l'IL-7 dans l'expansion des lymphocytes T, qui contrairement à l'IL-2, préservent les T CD8⁺ dans un état de différenciation moins avancé (140, 316, 317). Certaines études proposent également l'utilisation de petites molécules pouvant moduler certaines voies d'activation chez les lymphocytes T à transférer pour ainsi préserver ou inverser leur état de différenciation. Parmi ces nouveaux agents (250), on retrouve le TWS119, un inhibiteur pharmacologique de la *glycogen synthase kinase 3β* (GSK-3β) qui favorise l'expansion de T CD8⁺ affichant un phénotype partagé de T_N et T_{CM} dans un modèle murin. De plus, toujours dans un modèle murin, cette activation de la voie de Wnt engendrée par le TWS119 semble conférer à ces cellules une plus grande force de réponse anti-tumorale (303, 304).

Des études effectuées chez la souris relient de plus en plus l'activation de la voie de Wnt avec le développement des T CD8⁺ mémoires. Ces études ont démontré que le *T cell factor 1* (TCF-1), un facteur de transcription actif en aval de la voie canonique de Wnt, est essentiel à la formation des T CD8⁺ mémoires centraux. Lorsque des souris déficientes en TCF-1 sont infectées avec le *virus choriomeningitis lymphocytic* (LCMV), elles produisent

une première réponse effectrice normale, mais sont incapables de produire une réponse secondaire (314, 318). La manipulation de certaines composantes de la voie de Wnt chez les T CD8⁺ murins a vivement suscité notre intérêt. Le peu de résultats disponibles chez l'humain, combiné à nos travaux de caractérisation d'un inhibiteur de la voie de Wnt (DKK1) comme antigène tumoral, nous a amenés à nous interroger sur le sujet. Nous avons donc émis l'hypothèse que le TWS119 pourrait être utilisé pour modifier le phénotype et la qualité des T CD8⁺ humains vers un profil combiné de T_N et T_{CM}.

4.2 Matériels et Méthodes

Cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de donneurs normaux et de patients

Les donneurs normaux ont été recrutés au Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), à l'Hôpital Notre-Dame. Suite à la signature d'un consentement libre et éclairé, des échantillons sanguins ont été collectés. Les PBMC ont été isolés du sang complet suite à une centrifugation avec un milieu de séparation de lymphocytes (Ficoll, Wisent). Les patients atteints d'un cancer du poumon ont été recrutés en collaboration avec les Dr. Jocelyne Martin et Dr. Moishe Liberman, également à l'Hôpital Notre-Dame. Les patientes atteintes d'un cancer du sein ont été recrutées par l'entremise de la banque de cancer du sein du Réseau Cancer FRSQ. Encore une fois, tous les sujets participant à ce projet ont signé un consentement libre et éclairé, approuvé par le comité d'éthique institutionnel. Les échantillons sanguins ont été prélevés avant la chirurgie et les PBMC ont été isolés suivant la même procédure que celle appliquée avec les donneurs.

Isolement des cellules immunitaires ayant infiltrées les tumeurs (TIIC) de cancer du poumon et du sein.

Les échantillons cliniques de tumeurs de cancer du poumon et du sein ont été recueillis dans les instants suivant leur résection. Les échantillons prélevés (entre 0,2 et 5 g) ont été immédiatement immergés dans le milieu *Iscoe's modified Dulbecco's medium* (Invitrogen) sans aucun supplément et conservés sur glace. Afin de procéder à l'extraction des TIIC, les tumeurs ont subi un traitement inspiré de *Rosenberg et al.* (319). Brièvement, les tumeurs ont été découpées en morceaux d'environ 1 mm², puis digérées enzymatiquement dans 10 mL de RPMI (Wisent) additionné de collagénase IV, d'hyaluronidase et de DNase. Des antibiotiques (gentamicin et penicillin/streptomycin,

Wisent) ont également été ajoutés. Les mélanges ont été placés dans des tubes de 15 mL pour être ensuite incubés à température pièce sur une plaque rotative (50 rpm), pour une durée d'environ 16 h. Par la suite, les suspensions obtenues ont été filtrées sur des filtres *BD Falcon Cell strainer* de 40 µm (BD Biosciences), suivies de deux lavages au PBS (Wisent). Afin d'éliminer les cellules tumorales et les globules rouges de la suspension, certains échantillons ont subi une centrifugation avec Ficoll. Les TIIC ont ensuite été resuspendus dans le milieu *Iscove's modified Dulbecco's medium* supplémenté de 7,5% de sérum humain AB GemCell (Gemini, Bio-Products) additionné de 2 mM L-glutamine, 100 U/mL de pen/strep et 10 µg/mL de gentamicin, puis incubés pour un minimum de 18 h à 37°C en présence de 5% de CO₂. Cette incubation avait pour but de favoriser la réexpression des marqueurs de surface endommagés par la collagénase (*Grange et al.* Manuscrit en préparation).

Pour les TIIC cultivés avec des concentrations élevées d'IL-2, les suspensions cellulaires ont été mises directement en culture, suivant les 2 lavages au PBS, dans le milieu Iscove complet. 6 000 U/mL d'IL-2 ont été ajoutés et les cultures ont été incubées dans des plaques de 24 puits, à 37°C en présence de 5% de CO₂. 6 000 U/mL d'IL-2 ont été ajoutés tous les 5 jours et les cultures ont été diluées avec l'ajout de milieu Iscove complet si nécessaire. Lors de l'apparition d'agrégats résultant de la prolifération des lymphocytes T, les cultures ont été récupérées pour subir un protocole d'expansion rapide de lymphocytes T (REP) (320). Ce protocole consiste à mettre les lymphocytes en présence d'anti-CD3 (30 ng/mL, *OKT3*, eBioscience), de 600 U/mL d'IL-2 et d'un mélange de PBMC irradiés (5000 rad) provenant de 3 donneurs normaux. Les PBMC jouent un rôle de cellules nourricières et de support pour permettre à l'anti-CD3 de se fixer aux récepteurs Fc présents sur les monocytes présents. Ainsi, les lymphocytes T reçoivent les signaux nécessaires à leur prolifération. Après 8 à 10 jours d'expansion avec l'ajout d'IL-2 aux 2 à 3 jours, les lymphocytes T ont été dénombrés pour ensuite procéder à l'isolement des T CD8⁺.

Isolement des lymphocytes T CD8⁺ à partir des PBMC de donneurs normaux et des TIIC.

L'isolement des T CD8⁺, à partir des PBMC de donneurs ou des TIIC cultivés en présence de concentrations élevées d'IL-2, a été exécuté par séparation magnétique (sélection négative) avec une trousse d'enrichissement des T CD8⁺ *EasySep* (StemCell Technologies), selon les recommandations du fabricant. L'isolement des T CD8⁺, à partir des TIIC provenant directement de la digestion enzymatique, a également été réalisé par séparation magnétique, mais avec l'utilisation de la trousse de sélection positive de T CD8⁺ d'*EasySep*, suite à l'incubation des cellules visant à restaurer l'expression des marqueurs de surface. La sélection positive a été utilisée étant donné la présence de cellules tumorales et autres cellules dites "non sanguines" contenues dans la digestion tumorale. La présence de ces cellules n'est pas prévue au cocktail d'Ac utilisé dans la trousse de sélection négative. Étant donné le faible nombre de TIIC obtenu, après digestion enzymatique et incubation de 16 h (entre 1x10⁶ et 5x10⁶ cellules), les sélections positives ont été effectuées selon les recommandations du fabricant, pour un nombre de cellules inférieur à 10⁷ et la moitié du volume de nanoparticules recommandé.

Culture des lymphocytes T CD8⁺ de donneurs normaux et des TIIC en présence de l'activateur de la voie de Wnt, le TWS119.

La Figure 13 schématise la méthodologie employée pour la culture des T CD8⁺ de donneurs normaux, mais s'applique aussi à celle des T CD8⁺ provenant de TIIC. Brièvement, les T CD8⁺ ont été isolés des PBMC ou des TIIC, comme mentionné précédemment, et ont été cultivés dans des plaques de 96 puits dans lesquels avait été pré-incubé un anticorps anti-CD3 (*OKT3*). Une concentration de 1 µg/mL d'anti-CD3 a été utilisée pour une pré-incubation d'au moins 6 h et 5 µg/mL pour 2 h. Les T CD8⁺ ont été séparés en 2 groupes (avec TWS119 et sans TWS119). Les 2 groupes ont été mis en culture avec 600 U/mL d'IL-2. Le TWS119 a été ajouté à 5 uM au groupe correspondant et

l'équivalent en volume de DMSO a été ajouté au groupe sans TWS119. Les cellules ont été cultivées pendant 5 jours dans le milieu Iscove complet à 37°C en présence de 5% de CO₂. De l'Iscove complet et 600 U/mL d'IL-2 ont été ajoutés au 3^{ième} jour de culture. Les T CD8⁺ ont été récoltés au 5^{ième} jour pour subir un marquage de surface ou être restimulés pour ensuite subir un marquage intracellulaire. Dans le second cas, les cellules ont été incubées pour un maximum de 15 h (37°C, 5% de CO₂) dans une plaque de 48 puits avec un revêtement d'anti-CD3, en présence de 1 µg/mL d'anti-CD28 (BD Biosciences) et 5 µg/mL de brefeldin A (Sigma-Aldrich).

Culture des clones lymphocytes T CD8⁺ antigènes spécifiques en présence du TWS119.

Les clones de T CD8⁺ spécifiques à des antigènes du virus de l'influenza ont été précédemment générés dans le laboratoire (*Doucet et al.* ANNEXE II). Le clone spécifique à la protéine M1 reconnaît le peptide en position 58 à 66 (321). Le clone spécifique à la protéine NP reconnaît un peptide plus long, soit celui en position 68 à 86. Les 2 clones ont subi une REP de 8 jours avant d'être cultivés pendant 2 jours, avec ou sans TWS119, dans les conditions mentionnées ci-haut. Par la suite, les clones ont été mis en présence de lymphocytes B autologues immortalisés avec le virus Epstein-Barr (EBV-B) pré-chargés 3 h avec le peptide d'intérêt ou un peptide contrôle. À ce mélange, ont également été ajoutés l'anticorps anti-CD107a, 1 µM de monensin et 5 µg/mL de brefeldin A. Les clones, EBV-B et anticorps ont été incubés 6 h (37°C, 5% de CO₂) avant de procéder avec les marquages de surface et intracellulaire.

Cytométrie en flux

Les anticorps qui ont été utilisés pour les marquages de surface et intracellulaire sont les suivants : CD8-Pacific Blue (PB), CD3-Alexa Fluor 700, CD127- Phycoerythrin (PE), CD45RA-Phycoerythrin Cy7 (PECy7), CD62L-Phycoerythrin Cy5 (PECy5), IFN- γ -PE, CD107a-Allophycocyanin(APC) (tous de BD Biosciences) et CD133-APC (eBioscience). Des isotypes ont été utilisés pour chaque anticorps afin d'éliminer les possibilités de liaisons non-spécifiques. Les cellules mortes ont été exclues des analyses, grâce à un marquage avec la trousse de *Live/Dead Fixable Dead Cell* (Invitrogen). Pour les marquages de surface, les cellules ont été resuspendues dans le tampon de marquage de base (PBS additionné de 1% sérum fœtal bovin et 0,1% NaNO₃). L'incubation avec les anticorps a été effectuée sur glace et dans l'obscurité, pour une période de 30 min. Les cellules marquées ont ensuite été fixées dans le formaldéhyde 2% pour 10 min (sur glace). La trousse de marquage intracellulaire pour FoxP3 (eBioscience) a été utilisée pour le marquage intracellulaire (cytokine) des T CD8⁺ selon les recommandations du fabricant pour un marquage cytoplasmique (incubation de 30 min sur glace). Indépendamment du type de marquage, les cellules ont été resuspendues dans le tampon de marquage de base avant d'être analysées par cytométrie en flux sur le LSR II (BD Biosciences). Les résultats ont, par la suite, été analysés avec le logiciel *Flowjo software* (Tree Star).

4.3 Résultats et Conclusions

Évaluation du phénotype des lymphocytes T CD8⁺ de donneurs normaux suite à un traitement avec l'inhibiteur pharmacologique de la GSK-3 β (TWS119)

Après avoir confirmé, auprès du fabricant et dans la littérature, que le TWS119 pouvait également être effectif chez l'humain, nous souhaitons évaluer cet inhibiteur chez les T CD8⁺ humains; l'hypothèse initiale étant que le TWS119 pourrait être utilisé pour modifier le phénotype et la qualité des T CD8⁺ humains vers un profil combiné de T_N et T_{CM}.

Dans un premier temps, nous avons sélectionné différents marqueurs de surface que nous avons estimé être des équivalents de ceux retrouvés chez les T_{SCM} murins. Pour les marqueurs de T_N, nous avons conservé le CD62L, mais remplacé le CD44, par un équivalent retrouvé chez l'humain, soit le CD45RA. Comme marqueur de cellules mémoires, nous avons choisi d'évaluer l'expression du récepteur de l'IL-7 α , soit le CD127 (322). Comme Sca-1 est peu ou pas exprimé chez les cellules souches humaines, nous avons choisi les marqueurs CD34 et CD133 (323). Après quelques expérimentations, nous avons conservé uniquement le CD133 comme marqueur de cellules souches, CD34 n'étant jamais présent. La liste des anticorps correspondant à chacun des marqueurs sélectionnés est présentée en Figure 13 ainsi que la méthodologie que nous avons établie pour la culture des T CD8⁺ de donneurs normaux en présence du TWS119. Suivant les 5 jours de culture, des analyses multiparamétriques par cytométrie en flux ont été effectuées.

Tel qu'attendu, les T CD8⁺ traités avec le TWS119, bien qu'activés avec un anti-CD3 et de l'IL-2, présentaient une importante population (72%) à caractère naïf (CD45RA^{élevé}/CD62L^{élevé}), peu présente (14%) chez les T CD8⁺ activés sans TWS119 (Figure 14A, population A). Cette observation a également été répétée chez les T CD8⁺ de 2 autres donneurs (Figure 14B). Chez les T CD8⁺ autologues provenant du sang circulant (non-activés), nous avons constaté que la répartition des doubles positifs, pour ces

marqueurs, n'était pas la même (Figure 14A, panneau de droite). Le pourcentage de T CD8⁺ CD45RA⁺/CD62L⁺ est de 34% et donc beaucoup plus bas que les 72% retrouvés suite à une activation en présence du TWS119. Cependant, les T CD8⁺ autologues non-activés montrent une population CD45RA⁺/CD62L⁻ plus importante que celle retrouvée chez T CD8⁺ traités au TWS119 (41% contre 11%). Les T CD8⁺ provenant du sang circulant sont pour la plupart considérés comme naïfs. Il est intéressant de constater que ces populations "naïves" du sang circulant diffèrent du phénotype "naïf" retrouvé suite à un traitement au TWS119. Nous avons aussi constaté les T CD8⁺ cultivés en présence du TWS119 présentaient un fort pourcentage de cellules CD127⁺ et au moins le double d'expression moyenne (IMF) pour les 3 donneurs (Figure 14C et D, gauche). Nous avons observé le même phénomène pour le CD133 (Figure 14C et D, droite) avec une augmentation moins marquée pour l'IMF.

En résumé, l'activation de la voie de Wnt par un traitement au TWS119, provoque une augmentation de l'expression de marqueurs de cellules naïves (CD45RA et CD62L), mémoires (CD127) et souches (CD133) chez les T CD8⁺ humains, au même titre que ce qui a été observé chez la souris, suite à un traitement similaire (304) ou suite à une simulation de l'activation de la voie de Wnt par l'expression constitutive du TCF-1 (315).

Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ de donneurs normaux suite à un traitement avec le TWS119

En se basant sur l'expression des marqueurs de surface CD45RA et CD62L, nous avons défini 5 populations, suite à l'activation des T CD8⁺ de donneurs en présence ou non du TWS119 (Figures 14A et 15A). Nous avons, par la suite, caractérisé (cytométrie en flux) chacune de ces populations pour l'expression des marqueurs CD127 (Figure 15B) et CD133 (Figure 15C). Ainsi, nous avons observé une élévation du pourcentage de cellules exprimant le CD127 dans chacune des populations traitées au TWS119, comme le montre clairement le graphique en Figure 15B. Le pourcentage de T CD8⁺ exprimant le récepteur

de l'IL7, obtenu pour la population CD45RA⁻/CD62L⁻ (population E), est d'autant plus surprenant (entre 20 et 50%). Ces cellules représentent habituellement un groupe de cellules effectrices qui, après la phase d'expansion, ne persisteront pas et expriment donc peu de CD127 (322, 324). En ce qui concerne l'expression du marqueur des cellules souches CD133, nous avons premièrement remarqué qu'en l'absence de CD62L, il y a peu ou pas de CD133 exprimé à la surface des T CD8⁺, indépendamment de l'action du TWS119 (Figure 15C, population D et E). La littérature ne fait mention d'aucun lien direct entre l'expression de ces 2 molécules, si ce n'est qu'elles peuvent se retrouver exprimées sur une même cellule souche hématopoïétique au niveau de la moelle osseuse. La présence d'un ligand de L-selectine (CD62L) pourrait engendrer la sortie de ces cellules souches dans la circulation (325). Pour ce qui est de la comparaison d'expression du CD133 dans les populations exprimant cette molécule, les différences, surtout chez les donneurs #1 et #3, sont plus subtiles que celles observées pour le CD127, mais restent plus élevées dans les groupes où la voie de Wnt a été réactivée (Figure 15C, population A, B et C). Comme le démontre le graphique de la Figure 15D, nous avons également évalué l'expression concomitante de CD127 et CD133 à l'intérieur de chaque population. La population A de la Figure 15D représente le phénotype de T_{SCM} observés chez la souris, que nous cherchions à produire chez les T CD8⁺ humains (CD45RA^{élevé}/CD62L^{élevé}/CD127⁺/CD133⁺). Lorsque les T CD8⁺ sont cultivés en présence du TWS119, on remarque une augmentation du nombre de T CD8⁺ exprimant ces 4 marqueurs. Cette élévation varie selon les donneurs. Les pourcentages se situent entre 18% et 48%, suite à un traitement au TWS119, et entre 6 % et 8% sans TWS119. La variation entre les donneurs est prévisible lorsque l'on travaille chez l'humain. Nous avons également observé, dans les populations B et C (CD45RA^{int}/CD62L⁺ et CD45RA⁻/CD62L⁺) traitées avec le TWS119, une élévation du pourcentage de T CD8⁺ CD127⁺/CD133⁺ (Figure 15D). Ceci constitue la première démonstration d'un lien direct entre l'expression du CD127 et la voie de Wnt. Par contre, parmi les études sur les cellules souches, une a démontré un lien entre le CD133 et la voie de Wnt. Précisément, Wnt ne serait pas directement responsable de l'expression de CD133, mais serait retrouvé chez certaines cellules souches fœtales humaines exprimant le CD133.

Lorsque ces mêmes cellules sont mises en présence d'un des antagonistes de la voie de Wnt, le *secreted frizzled-related protein 1* (sFRP1), l'expression du CD133 diminue de 25% (326). Wnt n'est donc pas totalement responsable de l'expression du CD133, mais y joue un certain rôle.

En résumé, l'activation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺, suivant un traitement au TWS119, permet d'augmenter le pourcentage de cellules affichant un phénotype de T_{SCM}. Cette activation de la voie de Wnt semble également avoir un effet positif sur l'expression du récepteur de l'IL-7 dans les différentes populations de T CD8⁺. C'est la première fois que de telles observations sont rapportées chez l'humain.

Phénotype des lymphocytes T CD8⁺ ayant infiltrés des tumeurs de cancers communs suite à un traitement avec le TWS119

Après avoir observé un phénotype à la fois moins différencié et mémoire chez les T CD8⁺ de donneurs normaux activés et cultivés en présence du TWS119, nous avons évalué l'effet de stimulations similaires sur les T CD8⁺ ayant infiltrés des tumeurs de cancer du poumon. Suite à une digestion enzymatique (voir matériels et méthodes), nous avons appliqué la méthodologie de culture des T CD8⁺ avec le TWS119, décrite en Figure 13. Tel que présenté à la Figure 16A (gauche), nous avons premièrement observé une expression pratiquement nulle de CD45RA dans les 2 groupes de culture (avec et sans TWS119). Il a déjà été rapporté dans la littérature que le rapport CD45RA/CD45RO est beaucoup plus faible dans les tumeurs, en comparaison avec celui du sang circulant (327). Une population distincte de T CD8⁺ CD45RA^{int}/CD62L^{élevé} a cependant émergé dans le groupe traité au TWS119. Cette observation a été répétée chez les T CD8⁺ ayant infiltrés la tumeur de 2 autres patients atteints d'un cancer du poumon (Figure 16A, droite). Un traitement au TWS119 a aussi provoqué une augmentation marquée du pourcentage de cellules exprimant le marqueur CD127 ainsi qu'une augmentation dans l'intensité d'expression (Figure 16B et C, gauche). Enfin, nous avons également observé une

augmentation du marqueur CD133 (Figure 16B et C, droite) chez les T CD8⁺ de TIIC ayant été traités au TWS119. Ces observations nous portent à croire qu'il y a une activation de la voie de Wnt chez ces lymphocytes et que celle-ci pourrait préserver les cellules dans un état moins différencié, et persister davantage dans un contexte de transfert adoptif.

L'activation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺ avec le TWS119 amène un arrêt de la prolifération, ce qui a déjà été rapporté dans le modèle murin (304). Pour favoriser une meilleure expansion, nous avons cultivé les TIIC recueillis à la suite des digestions enzymatiques, en présence de concentrations élevées d'IL-2 (319). Lorsque les cellules ont commencé à proliférer, nous leur avons fait subir un protocole d'expansion rapide (REP; à l'aide d'anti-CD3; voir matériels et méthodes) pour atteindre un nombre appréciable de cellules (>10⁸). Cette culture de TIIC en plusieurs étapes se rapproche du protocole de culture de *young TIL*, maintenant utilisé dans les transferts adoptifs effectués au *Surgery Branch, NIH*, dans le groupe du Dr. Rosenberg (229). Ce point sera discuté plus amplement à la *Section 5*. Nous avons réalisé ce genre de culture avec les TIIC provenant d'une tumeur de cancer du poumon (Figure 16D, panneaux de gauche) et d'une tumeur de cancer du sein (Figure 16D, panneaux de droite). Comme les analyses le montrent à la Figure 4D, la culture des TIIC avec de fortes concentrations d'IL-2, amène une différenciation chez les T CD8⁺ qui ne semble pas être affectée par l'activation de la voie de Wnt avec le TWS119.

Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ ayant infiltrés des tumeurs de cancers du poumon, suite à un traitement avec le TWS119

Nous avons précédemment observé que la culture de T CD8⁺ isolés de TIIC, en présence du TWS119, favorisait la formation d'une population distincte de T CD8⁺ CD45RA^{int}/CD62L^{élevé} (Figure 16, à gauche et Figure 17, en haut). Cette population bien délimitée n'est pas retrouvée chez les T CD8⁺ de TIIC activés sans TWS119 (Figure 17, en bas). Lorsque les cellules sont traitées avec le TWS119, nous retrouvons plus de 60% des CD45RA^{int}/CD62L^{élevé} exprimant également les marqueurs CD127 et CD133 (Figure 17, en

haut, à droite). Cette population de T CD8⁺ CD45RA^{int}/CD62L^{élevé}/CD127⁺/CD133⁺ se rapproche beaucoup du phénotype T_{SCM} et est absente chez les T CD8⁺ de TIIC cultivés sans le TWS119 (Figure 17, en bas, à droite). De plus, la population CD45RA^{int}/CD62L^{élevé} retrouvée chez les T CD8⁺ de TIIC cultivés avec le TWS119 présente un fort pourcentage (près de la moitié) de cellules exprimant le CD127 (Figure 17, en haut). En absence de TWS119, les T CD8⁺ CD45RA^{int}/CD62L^{élevé} (de TIIC) activés ne présentent qu'un faible pourcentage exprimant le CD127 (Figure 17, en bas), tout comme ce que nous avons observé chez les donneurs normaux (Figure 15B, population E).

Nous avons ainsi démontré que la culture de T CD8⁺ ayant infiltrés des tumeurs, en présence du TWS119, permet d'engendrer des populations de cellules présentant un phénotype moins différencié (CD45RA^{int}/CD62L^{élevé}/CD127⁺/CD133⁺), malgré l'activation de ces cellules. Nous avons également démontré que ce traitement favorise l'émergence d'une population hétérogène, et que chaque sous-type présente un phénotype à caractère plus "persistant" (CD127⁺).

Évaluation de la fonction des lymphocytes T CD8⁺ suite à un traitement avec le TWS119.

Après avoir observé l'impact du traitement au TWS119 sur le phénotype des T CD8⁺ de différentes origines, nous avons évalué l'impact sur la fonction des lymphocytes T.

Des lymphocytes T CD8⁺ furent stimulés à partir des PBMC de donneurs normaux selon la même procédure qu'à la Figure 13 et nous avons évalué la production de l'IFN- γ par cytométrie en flux intracellulaire (ICS). Suite à une stimulation de 16 h avec de l'anti-CD3 et de l'anti-CD28, nous avons évalué la présence de cette cytokine chez les T CD8⁺ de 2 donneurs. Nous avons choisi ce type de stimulation pour se rapprocher le plus possible d'une stimulation TCR-dépendante. Les pourcentages de cellules IFN- γ positives, obtenues

avec les T CD8⁺ cultivés en présence de TWS119, comparés à ceux cultivés sans TWS119, étaient similaires (Figure 18A). Lorsque nous avons évalué l'intensité d'expression d'IFN- γ pour chaque T CD8⁺, une augmentation fut détectée chez les T CD8⁺ du donneur #1 cultivés en présence de TWS119 (IMF de 2640 contre 1700, Figure 18B). Cette augmentation était moindre chez les T CD8⁺ du donneur #2 (IMF de 2174 contre 1750, Figure 18B). Dans les prochaines expériences, nous stimulerons les lymphocytes T de diverses façons, comme par exemple, par réaction leucocytaire mixte (MLR). Sans être une réponse spécifique à un antigène, l'utilisation de la MLR nous permettrait peut-être d'obtenir une réponse plus forte en cytokine. Nous souhaitons également évaluer d'autres cytokines à l'aide d'analyses multiparamétriques (multiplex) nous donnant la possibilité d'évaluer la présence de près de 30 cytokines.

Enfin, dans le but d'évaluer l'impact du TWS119 dans la génération d'une réponse spécifique à un antigène, nous avons utilisé cet inhibiteur pharmaceutique dans des stimulations peptidiques de T CD8⁺ débutées à partir de PBMC (*Section 3- Manuscrit 2, Materials and Methods*). Comme il a été mentionné précédemment, un traitement au TWS119 inhibe la prolifération des cellules naïves. Ainsi, les stimulations peptidiques avec le TWS119, n'ont pas fonctionnées puisqu'elles avaient comme point de départ des PBMC. Comme système modèle de lymphocytes T spécifiques à un antigène, nous avons utilisé des clones de T CD8⁺ déjà produits dans notre laboratoire (manuscrit en ANNEXE II), soit précisément 2 clones spécifiques aux protéines M1 et NP du virus de l'influenza. Ce faisant, nous avons un nombre suffisant de lymphocytes T qui ont été cultivés 2 jours avec ou sans TWS119. Nous les avons ensuite mis en présence de cellules T2 chargées avec leur peptide spécifique ou un peptide contrôle. La production de l'IFN- γ a été évaluée par ICS ainsi que la présence de CD107a, ici utilisé comme marqueur de dégranulation. Comme le montre la Figure 18C, le clone spécifique au peptide de la protéine M1, cultivé en présence de TWS119, était à la fois positif pour IFN- γ et CD107a. Ce clone exprimait également plus d'IFN- γ et de CD107a que le clone non traité au TWS119 (Figure 18D). Ces observations n'ont cependant pas été reconduites pour le clone reconnaissant

spécifiquement un peptide de la protéine NP. Nous pensons qu'il sera intéressant d'évaluer l'impact du TWS119 sur plusieurs clones ayant différentes spécificités, particulièrement des clones dirigés contre des antigènes du soi, afin de se rapprocher du contexte de l'immunothérapie du cancer. Nous croyons également que l'analyse de cytokines par multiplex sera aussi très pertinente et d'avantage révélatrice.

En conclusion, nous avons montré, pour la première fois chez l'humain, que l'activation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺, suite à un traitement au TWS119, favorise un phénotype de T_{SCM} (CD45RA⁺ ou int/CD62L^{élevé}/CD127⁺/CD133⁺). De façon générale, cette l'activation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺ semble avoir un lien direct avec l'expression du récepteur de l'IL-7, puisque celui-ci s'en trouve augmentée chez toutes les populations confondues. Pour ce qui est de l'impact de l'activation de la voie de Wnt sur la fonction des T CD8⁺, il est prématuré de se prononcer, mais nous pensons que les particularités phénotypiques observées dans cette étude peuvent certainement avoir un impact fonctionnel.

Figures

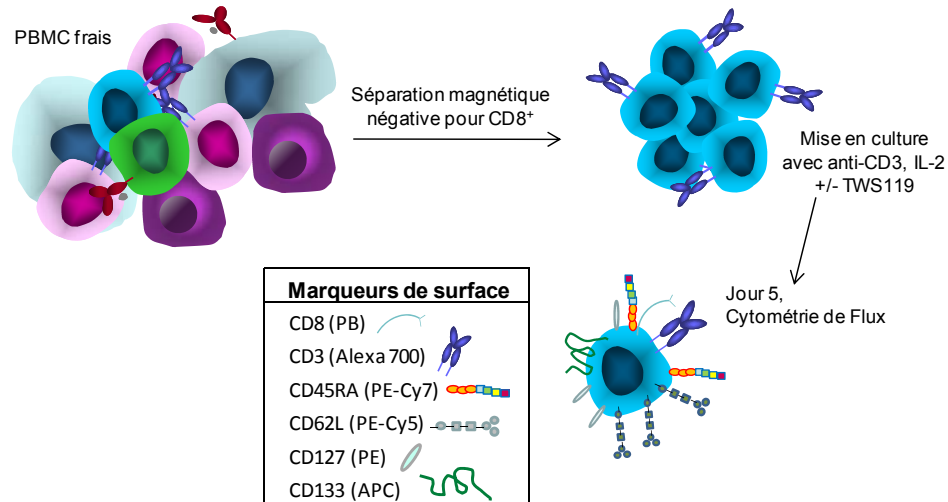


Figure 13. Protocole général d'activation et de culture des lymphocytes T CD8⁺ stimulés par le CD3 en présence d'IL-2, avec ou sans l'activateur de la voie de Wnt (TWS119)

Légende : Les PBMC de donneurs normaux ont été isolés du sang complet et les T CD8⁺ en ont été enrichis à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques (sélection négative). Les T CD8⁺ ont ensuite été cultivés dans des plaques de 96 puits dont les fonds ont été recouverts d'anti-CD3, en présence de 600 U/mL d'IL-2. Le TWS119 (ou son diluant) fut ajouté à 5 µM aux cultures et de l'IL-2 (600 U/mL) a été ajouté au 3^{ème} jour. Au 5^{ème} jour de culture, un marquage de surface a été réalisé avec des anticorps marqués aux différents fluorochromes identifiés. La caractérisation des T CD8⁺ a par la suite été effectuée par cytométrie en flux.

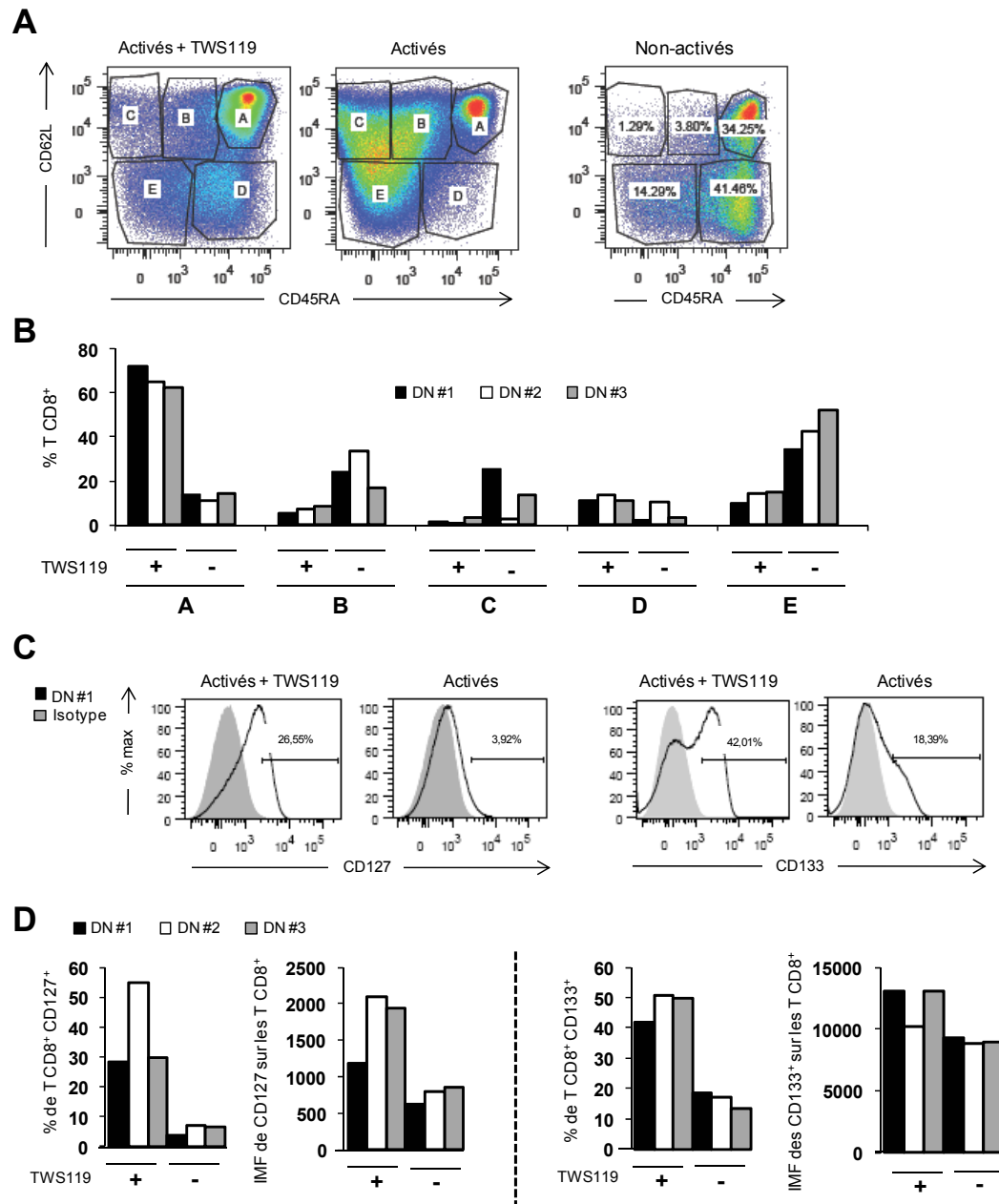


Figure 14. Caractérisation de marqueurs de différenciation sur les lymphocytes T CD8⁺ de donneurs normaux cultivés avec le TWS119

Légende : Les lymphocytes T CD8⁺ de trois donneurs (DN) ont été étudiés (par cytométrie en flux) pour l'expression des différents marqueurs de surface suivant la méthodologie décrite en Figure 13. **A)** Analyse représentative par nuages de points montrant l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L chez les T CD8⁺ (DN #1) cultivés en présence ou non du TWS119. À titre comparatif, l'analyse des T CD8⁺ autologues provenant directement des PBMC non cultivés est également présentée (panneau de droite). Les différentes populations ont été délimitées avec l'utilisation des isotypes respectifs pour chaque marqueur. **B)** Analyse montrant le pourcentage de T CD8⁺ contenu dans chaque groupe, établi selon l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L, pour les 3 donneurs (DN #1 à #3). **C)** Analyse représentative présentée en histogramme montrant l'expression des marqueurs CD127 et CD133 chez les T CD8⁺ du DN #1 cultivés avec ou sans TWS119. **D)** Graphiques représentant le pourcentage de T CD8⁺ exprimant respectivement les marqueurs CD127 (gauche) et CD133 (droite) ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) suivant l'expression du CD127 sur les T CD8⁺ totaux ou du CD133 sur la population positive l'expression du CD133 (pour les 3 donneurs).

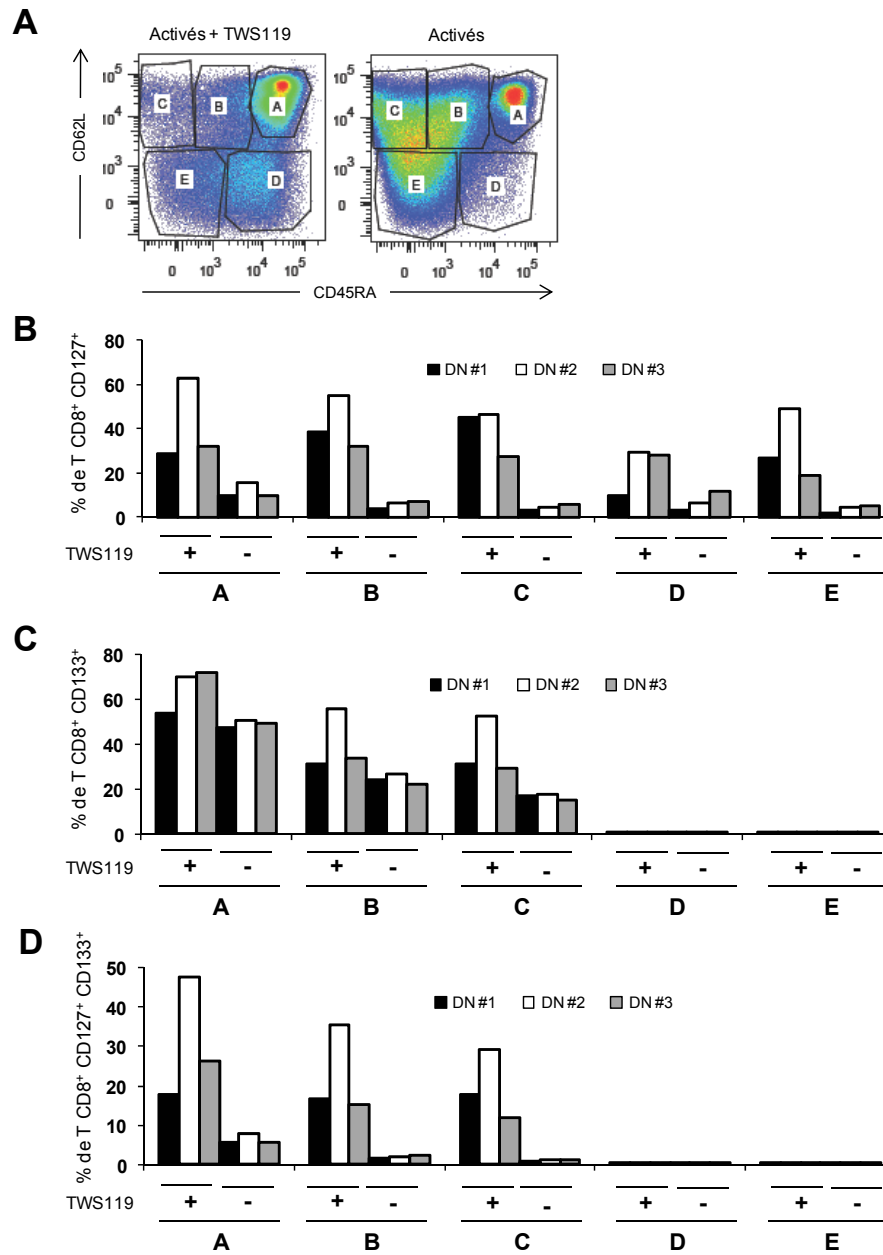


Figure 15. Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺ définies par l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L, chez les donneurs normaux après culture avec le TWS119

Légende : **A)** Analyse représentative pour la délimitation des populations selon l'expression du CD45RA et CD62L par les T CD8⁺ totaux (identique à la Figure 14A). **B)** Graphiques représentant le pourcentage de T CD8⁺ exprimant le marqueur CD127 pour chaque population (définies en A) et le marqueur CD133 (**C**) ou la co-expression des 2 marqueurs (**D**), pour les 3 donneurs.

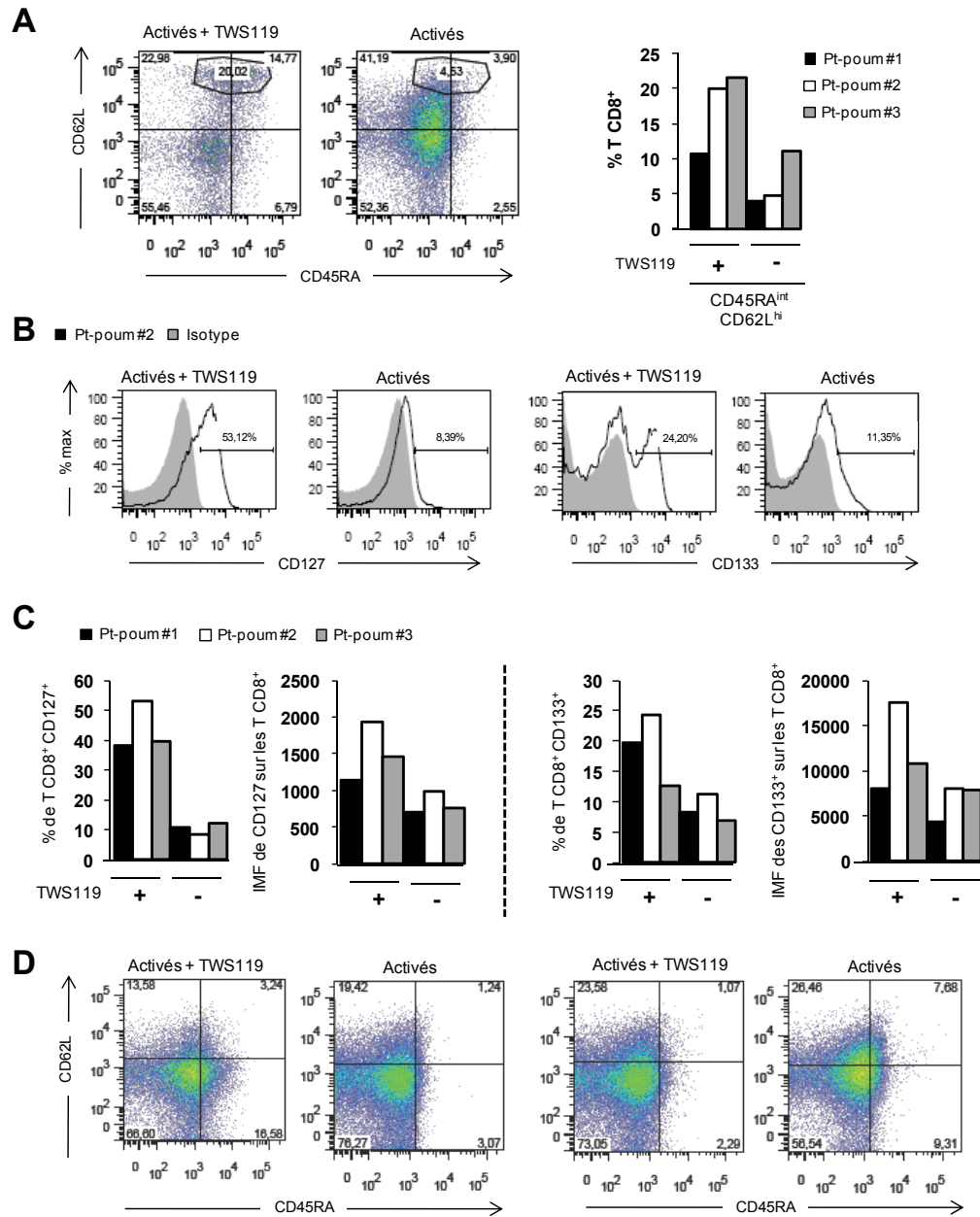


Figure 16. Caractérisation de marqueurs de différenciation sur les lymphocytes T CD8⁺ des cellules immunitaires ayant infiltrées des tumeurs de cancer du poumon et du sein, cultivés avec le TWS119

Légende : Le phénotype des T CD8⁺ ayant infiltrés les tumeurs de poumon de 3 patients (Pt-poum) a été étudié (par cytométrie en flux) pour l'expression des différents marqueurs de surface suivant la méthodologie décrite en Figure 13, précédée par une digestion enzymatique (voir matériels et méthodes) **A)** Analyse représentative par nuages de points de l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L chez les T CD8⁺ provenant des TIIC du Pt-poum #2 (cultivés avec ou sans TWS119). Le graphique de droite montre le pourcentage de T CD8⁺ présent dans la population CD45RA^{int}/CD62L⁺ pour les 3 tumeurs. **B)** Analyse par histogramme montrant l'expression des marqueurs CD127 et CD133 chez les T CD8⁺ provenant des TIIC du Pt-poum #2 (avec ou sans TWS119). **C)** Pourcentage de T CD8⁺ exprimant respectivement les marqueurs CD127 (gauche) et le CD133 (droite) ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) suivant l'expression de ces marqueurs sur les T CD8⁺ (pour les 3 patients). **D)** Les TIIC d'une tumeur de cancer du poumon (panneaux de gauche) et ceux d'une tumeur de cancer du sein (panneaux de droite) ont été cultivés en présence de hautes concentrations d'IL-2 (6 000 U/mL) avant de subir le traitement décrit en Figure 1. L'analyse par nuages de points montre l'expression de CD45RA et CD62L chez les T CD8⁺ ayant infiltrés ces deux tumeurs avec ou sans traitement au TWS119.

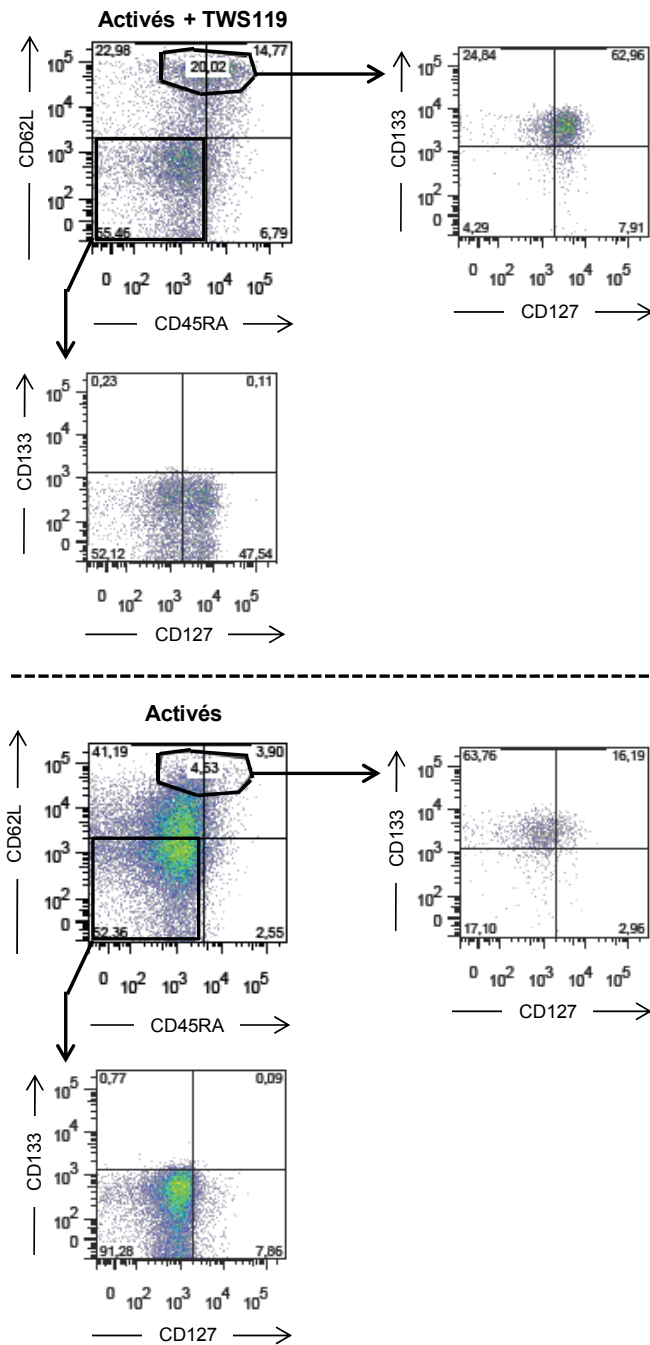


Figure 17. Caractérisation des différentes populations de lymphocytes T CD8⁺, isolés des cellules immunitaires ayant infiltrées des tumeurs du poumon, définie par l'expression des marqueurs CD45RA et CD62L, après culture avec le TWS119

Légende : L'analyse par nuages de points a été effectuée avec les T CD8⁺ ayant infiltrés la tumeur du Pt-poum #2 et est représentative des résultats obtenus avec les T CD8⁺ ayant infiltrés la tumeur de 2 autres patients atteints d'un cancer du poumon.

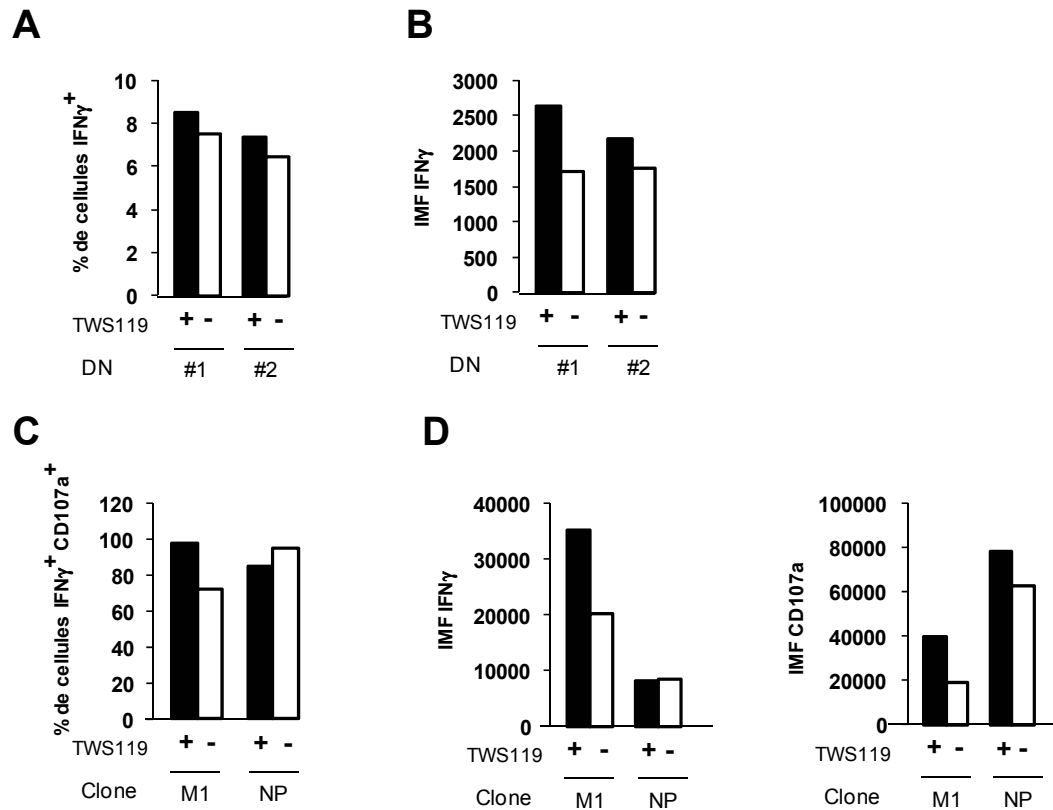


Figure 18. Évaluation fonctionnelle des lymphocytes T CD8⁺ suivant un traitement au TWS119

Légende : La production d'IFN- γ par les T CD8⁺ de 2 donneurs a été évaluée par cytométrie en flux après traitement (Figure 1) et une stimulation avec un anti-CD3 et un anti-CD28 par la suite. Cette évaluation est représentée en **A**) par le pourcentage de T CD8⁺ marqués positivement pour la présence intracellulaire d'IFN- γ et en **B**) par l'intensité moyenne de fluorescence (IMF) émise par les T CD8⁺ marqués positivement pour l'IFN- γ . Toujours par cytométrie en flux, la réponse en IFN- γ et la présence du CD107a en surface, ont été évaluées chez des clones T CD8⁺ spécifiques à un Ag viral donné (M1 ou NP d'influenza), suite à une culture de 2 jours avec ou sans TWS119 (**C et D**). En **C**) est présenté le pourcentage des clones marqués positivement pour la présence intracellulaire d'IFN- γ conjointement avec celle de CD107a à la surface, suite à une stimulation Ag

spécifique. **D)** IMF émise par les clones marqués positivement pour l'IFN- γ (gauche) et pour le CD107a (droite).

SECTION 5. DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

L'immunothérapie du cancer représente une alternative thérapeutique très intéressante ayant démontré des résultats convaincants chez des patients atteints, entre autre, d'un mélanome de stade avancé, réfractaire à tous autres traitements (222). Certains de ces patients traités par transfert adoptifs de TIL ont non seulement vu leur cancer régresser, mais demeurent sans trace de maladie à ce jour. D'autres patients ont obtenu des résultats plus modestes, se traduisant soit par une réduction de la taille de certaines de leurs métastases ou par la stabilisation de leur maladie (222). Bien qu'ici, on ne parle pas de guérison complète, nous pouvons tout de même apprécier l'augmentation de l'espérance de vie, amenée par la stabilisation de la maladie, chez ces patients pour qui le mot avenir ne faisait plus partie de leur vocabulaire. Les réponses observées dans les essais cliniques, qu'elles soient totales ou partielles, nous permettent de fonder de grands espoirs sur cette approche, utilisée seule ou combinée aux traitements déjà existants.

Bien que les différents essais cliniques laissent envisager des perspectives prometteuses pour l'immunothérapie du cancer, ils mettent également en évidence plusieurs obstacles à surmonter avant de pouvoir administrer ce genre de traitement dans les hôpitaux autres que les centres spécialisés ayant développé cette expertise. Tout d'abord, si l'on aborde le type de cancer traité avec l'immunothérapie, principalement celle à médiation cellulaire, on constate que le mélanome est le cancer le plus souvent interpellé. Une majorité d'essais cliniques ont été effectués sur ce cancer. Il devient important de démocratiser l'immunothérapie tumorale aux cancers communs autre que le mélanome, en tentant d'y appliquer les dernières trouvailles mises en évidence par les essais effectués pour ce cancer. Il est toutefois important de ne pas perdre de vue que les essais cliniques effectués chez le mélanome étaient aussi discriminants pour ce même type de cancer puisque les patients sélectionnés étaient, comme souligné plus tôt, de stade très avancé et

pour la plupart, réfractaires aux autres traitements. Il est possible de spéculer que l'immunothérapie du cancer obtiendrait un meilleur taux de réussite si les essais cliniques comportaient des cohortes de patients moins avancés dans la progression de la maladie.

Toujours dans l'optique d'étendre l'immunothérapie aux cancers communs autre que le mélanome et de rejoindre différents types de cancers touchant un même organe, il est important de continuer l'identification et la caractérisation de nouveaux TAA. L'utilisation de peptides provenant d'une grande variété de TAA dans un même vaccin peut nous permettre d'éviter l'immunosélection des cellules tumorales et la réémergence du cancer. De plus, l'identification de nouveaux antigènes tumoraux et de peptides reconnus par les T CD8⁺, peut permettre, par le fait même, l'identification de nouveaux TCR dirigés contre un TAA et pouvant être utilisés dans le transfert adoptif de lymphocytes T génétiquement modifiés.

Enfin, les améliorations apportées à l'immunothérapie du cancer à médiation cellulaire doivent non seulement s'attarder à augmenter la variété et la force de la réponse immunitaire anti-tumorale, mais également augmenter la persistance des cellules suite au traitement. Il est nécessaire de définir le profil idéal du lymphocyte capable de remplir ces 2 missions et les manipulations permettant d'obtenir ce phénotype souhaité.

Le projet de doctorat, dont les résultats sont présentés dans cet ouvrage, avait comme objectif général, l'amélioration de l'immunothérapie du cancer à médiation cellulaire pour les cancers communs autre que le mélanome. Cette amélioration se voulait la proposition de 2 stratégies, formant ainsi les 2 objectifs de ce projet de doctorat. Le premier objectif avait pour but l'identification de nouveaux antigènes tumoraux pour le cancer du sein et autres cancers communs. Il a donné lieu à l'identification de 2 candidats potentiels, soit DKK1 et PDEF. Comme spécifié précédemment, PDEF fut par la suite caractérisé par le Dr Simon Turcotte (ANNEXE I). Quant à l'expression de DKK1 dans les cancers communs, elle a été rapportée pour la première fois dans cet objectif (SECTION 2) de même que l'immunogénicité de DKK1, menant à l'identification de T CD8⁺ pouvant

reconnaître un peptide de DKK1 et l'étude plus poussée du profil de sécrétion de cytokines d'un clone de T CD8⁺, dans le cancer du poumon (SECTION 3). Le deuxième objectif a comme fil conducteur la voie canonique de Wnt dont DKK1 fait partie, mais avec une toute autre utilisation pour cet objectif. Le but étant de générer des T CD8⁺ démontrant un profil partagé de cellules mémoires et cellules souches (T_{SCM}); l'existence de ces cellules n'ayant pas été rapportée chez l'humain rendait cet objectif palpitant. La stratégie employée pour engendrer ce type de cellules présentait également une nouveauté chez l'humain, car le lien entre la voie de Wnt et les lymphocytes T mémoires a seulement été mis en évidence chez les souris ainsi que la génération de T_{SCM} par l'activation de cette voie. Si le profil phénotypique et fonctionnel des T CD8⁺ humains, suite à l'activation de la voie de Wnt, est pertinent, il serait possible de les utiliser en immunothérapie à médiation cellulaire.

La section présente sera donc un résumé des accomplissements pour chacun des objectifs ainsi qu'une critique des résultats et les perspectives qui seront à envisager, suite aux observations réalisées.

5.1 Expression de DKK1 dans les cancers du sein hormono-indépendants, et autres cancers communs

5.1.1 Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats

Dans le cadre de notre démarche pour identifier de nouveaux TAA pour les cancers communs, nous avons fait appel à une approche bio-informatique. Cette approche, qui se résume à la consultation de banques d'ADNc avec accès public, nous a permis de comparer l'expression de plusieurs gènes dans les cancers du sein et les tissus normaux. Les résultats générés à partir de cette consultation ont été considérés comme des données préliminaires et les gènes, dont la surexpression dans les cancers du sein a été prédite par cette approche, ont été sélectionnés comme TAA candidats. L'exploration de l'expression de ces gènes candidats dans différents tissus normaux provenant d'une banque d'ARNm, a souligné la non infaillibilité de l'approche bio-informatique puisque certains gènes dont la prédiction d'expression dans les tissus normaux était nulle se sont avérés y être exprimés de façon appréciable (Supplementary data Figure 1^{ml}A). Le deuxième test préliminaire effectué a été d'évaluer l'expression de nos gènes candidats dans différentes lignées cellulaires de cancer du sein ainsi que des lignées cellulaires lymphocytaires (activées ou non) correspondantes ou non aux lignées cancéreuses testées (contrôle négatif) (Figure 1^{ml}A et Supplementary data Figure 1^{ml}B). Ainsi, à la suite de ces validations, DKK1 est demeuré un candidat de choix comme TAA potentiel dans le cancer du sein.

C'est par l'analyse de l'expression de l'ARNm de DKK1 dans les échantillons cliniques provenant de tumeurs de cancers du sein que l'intérêt pour DKK1 s'est accentué. En effet, l'analyse de l'expression de DKK1 sur 73 échantillons a révélé un profil d'expression dans les tumeurs du sein triple négatives (ER⁻, PR⁻, Her-2/*neu*⁻). De plus, la moitié des tumeurs provenant de patientes ayant déclaré avoir une histoire familiale de cancers du sein a aussi révélée l'expression de DKK1 (Figure 3^{ml}A, B, C et D). Le peu de tumeurs provenant de patientes démontrant une atteinte métastatique de plus de 10 ganglions et suivant donc une stadification TNM élevée, témoignant d'un stade avancé de

la maladie, était également positif pour l'expression de DKK1 (Figure 3^{ml}E et F). L'ensemble de ces résultats nous a révélé une expression de DKK1 dans les cancers du sein comportant un mauvais pronostic.

L'accès aux échantillons cliniques de tumeurs de cancer du poumon nous a permis de constater que 50% des tumeurs exprimaient DKK1. Une grande majorité de ces tumeurs étaient de type NSCLC (Figure 4^{ml}D). L'accès aux échantillons cliniques nous a également permis d'établir que 6 tumeurs de cancer du rein sur 20 exprimaient DKK1 (Figure 4^{ml}E). Nous avons également mis en évidence l'expression de l'ARNm de DKK1 dans différentes lignées cellulaires de cancer comme ceux de l'ovaire, de la prostate, du colon et du mélanome, sans pouvoir corréler l'expression de la protéine avec la présence de l'ARNm pour ce dernier (Figure 4^{ml}A, B et C).

Finalement, en ce qui concerne l'expression de DKK1 dans les tissus normaux, nous avons observé ce qui avait déjà été globalement rapporté dans la littérature, soit une expression importante au niveau du placenta (Figure 2^{ml}A, B et C).

Cette étude concluait que DKK1 pouvait être envisagé comme marqueur pronostique pour le cancer du sein. Il est évident que les données sur le taux de survie, corrélées avec l'expression de DKK1 dans la tumeur, auraient été nécessaires pour valider cette conclusion. Le constat de l'expression de DKK1, dans les cancers communs, rapportée dans cette étude constituait tout de même une nouveauté et a permis plus tard la publication de nouvelles études validant certaines de ces corrélations.

Expression de DKK1 dans les cancers du sein

Les données transcriptionnelles que nous rapportons dans cette étude témoignent de l'expression de DKK1 dans 21 tumeurs provenant d'un cancer du sein sur un total de 73 échantillons cliniques testés. Ces données, recueillies grâce à l'utilisation d'une méthode de

quantification sensible et reproductible de RT-PCR en temps réel, viennent corroborer les observations préliminaires de l'expression de l'ARNm de DKK1 dans certaines lignées cellulaires de cancer du sein. Le point le plus intéressant est sans aucun doute l'expression de DKK1 retrouvée chez la moitié des tumeurs hormono-indépendantes. En ajoutant le fait que ces tumeurs positives pour DKK1 sont également négatives pour l'expression d'Her-2/*neu*, nous remarquons une avenue thérapeutique intéressante chez un profil de tumeurs à cours de traitement. D'emblée, les tumeurs hormono-indépendantes sont souvent des tumeurs moins bien différenciées (grade 2 ou 3), ne répondant pas aux traitements anti-oestrogéniques (328). Lorsqu'on ajoute à l'équation l'absence d'expression d'Her-2/*neu*, on soustrait alors la possibilité d'un traitement à l'Herceptin®. Ces tumeurs triples négatives ont souvent été décrites comme agressives, présentant un mauvais pronostic, étant sensibles aux traitements de chimiothérapie mais souvent associées à une récurrence due à la persistance de résidus tumoraux et présentant peu d'ouverture de traitements (329-331). Un traitement par immunothérapie faisant appel à une réponse immunitaire dirigée contre DKK1 pourrait représenter une alternative pour 50% des patientes triples négatives de notre cohorte de patientes atteintes d'un cancer du sein (ce pourcentage n'est pas présenté dans le manuscrit à la SECTION 2, il a été établi par la suite).

Une mutation affectant les gènes BRCA1 et BRCA2 impliqués dans la réparation de l'ADN, le maintien de la stabilité des chromosomes et la progression du cycle cellulaire sous le contrôle de p53, est connue comme un important facteur génétique prédisposant au développement d'un cancer du sein (332-336). Les tumeurs comportant une mutation de BRCA1 sont fréquemment associées à un phénotype triple négatif et l'expression de p53 y est souvent retrouvée (337). Il a été rapporté que l'expression de DKK1 pouvait être régulée par la p53 endogène, suite à l'activation de la voie de Wnt. Cependant, lorsque la voie de Wnt n'est pas activée, la surexpression de DKK1 n'apporte aucun effet anti-prolifératif sous-entendant l'action de p53 (338). L'expression de p53 n'a pas été vérifiée dans notre cohorte de patientes triples négatives et donc aucun lien n'a pu être établi avec la présence de DKK1. Aucun lien n'a pu être établi également avec BRCA1, l'histoire

génétique des patientes n'étant pas investiguée dans le cadre de notre banque. Il est clair que ce point serait très intéressant à investiguer puisque nous avons rapporté l'expression de DKK1 chez 50% des patientes ayant déclaré avoir une histoire de cancer du sein dans leur famille immédiate (Figure 3^{ml}D). Le statut de β -catenin des tumeurs de la banque serait aussi une donnée intéressante à ajouter au profil permettant ainsi une caractérisation plus complète sur l'état d'activation de la voie de Wnt des tumeurs triples négatives, exprimant DKK1 avec ou sans l'expression de p53 et présentant une histoire génétique.

Nous avons également démontré que DKK1 était exprimé chez les tumeurs de stade IIIC ($T_{\text{varié}}$ N3M0) indépendamment du statut hormonal des tumeurs de cancer du sein, c'est-à-dire des tumeurs de tailles variées mais provenant de patientes présentant plus de 10 ganglions lymphatiques axillaires touchés par des métastases. Ce critère est considéré comme le plus sombre et le plus significatif en regard au pronostic (339). La tumeur primaire des patientes de ce groupe était positive pour l'expression de DKK1, mais nous n'avons malheureusement pas eu la chance de vérifier l'expression de DKK1 dans les ganglions positifs pour l'atteinte métastatique. Il serait très intéressant de récupérer les étalages de tissus sur lame de ces échantillons faits en pathologie lors de la chirurgie initiale et d'y effectuer un marquage immunohistochimique pour DKK1 comme il a d'ailleurs été fait dans l'ovaire (287). La présence de DKK1 dans ces ganglions pourrait nous laisser envisager un rôle direct ou indirect de ce dernier dans l'invasion tumorale. D'ailleurs *Yamabuki et al.* avaient observé une augmentation de mobilité sur matrigel, suite à la transfection de l'ADNc de DKK1 dans les lignées cellulaires NIH-3T3 et COS-7, laissant supposer une mobilité cellulaire suite à l'expression de DKK1 (285).

Concernant l'expression de DKK1 retrouvée dans le cancer du sein en générale, la littérature est plutôt variée et aucun consensus ne se dégage. Quelques mois suivant la parution de notre manuscrit, *Voorzanger-Rousselot et al.* publiaient une étude rapportant l'augmentation de l'expression de DKK1 dans les métastases osseuses de cancer du sein (340). Ces métastases osseuses étaient de type ostéoclastique, se traduisant par une résorption osseuse non-souhaitée, comme celle retrouvée dans le myélome multiple avec

atteinte osseuse et dans les métastases osseuses du cancer de la prostate, corrélant avec la présence de DKK1 (284, 341). Tout comme nous, *Voorzanger-Rousselot et al.* ont montré que les lignées cellulaires de cancer du sein MDA231 et MCF-7 exprimaient l'ARNm de DKK1 et pouvaient sécréter la protéine (mise en évidence par ELISA) (340). Ces 2 lignées possèdent la capacité d'engendrer des métastases osseuses ostéolytiques. Ils ont également mis en évidence une quantité plus élevée de DKK1 dans le sérum de patientes atteintes d'un cancer du sein avec métastases osseuses. Ils n'ont cependant pas montré que c'était l'action direct du DKK1 sécrété par les cellules tumorales qui était responsable de cette destruction osseuse (340). Bien que cette étude ne mettait pas en lumière les mêmes aspects que la nôtre et se concentrait sur les métastases, il n'en reste pas moins qu'elle soulignait la présence de DKK1 au niveau de tumeurs du sein arborant un mauvais pronostic, corroborant nos observations. À l'opposé, un groupe rapportait récemment que l'abolition de l'expression de DKK1 dans les MCF-7, par l'utilisation de petits ARN interférants (siRNA), rendait ces cellules 10% plus invasives, alors que la surexpression de DKK1 par simple transfection d'un plasmide conférait à une lignée clonale de MCF-7 (LM-MCF-7) considérée comme plus invasive, une diminution de 24% de sa mobilité (342). L'augmentation de mobilité des MCF-7, suite à l'inhibition de DKK1, semblait être attribuée à l'activation de la voie de Wnt. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'augmentation était seulement de 10% et que la comparaison entre le DKK1 sécrété naturellement par la cellule tumorale et celui transfecté peut ne pas être exacte. Le DKK1 exprimé par la cellule tumorale pourrait avoir une mutation ou un changement quelconque par rapport au DKK1 cloné dans un vecteur à partir d'une source autre que la cellule cancéreuse. De plus, la lignée LM-MCF-7, qui à la base possédait un plus grand pouvoir de mobilité, présentaient un taux appréciable de β -catenin phosphorylée ce qui ne témoigne pas d'une voie de Wnt complètement active.

L'étude probablement la plus en contradiction avec la nôtre est celle du groupe du Dr H. Zarbl dont les conclusions proposent DKK1 comme un gène suppresseur de tumeurs dans le cancer du sein. Leur conclusion est basée sur une surexpression forcée de DKK1

dans 2 lignées de cancers du sein dont la voie de Wnt n'est pas activée à la base. Une de ces lignées est négative pour DKK1 et l'autre, MDA231 exprime des niveaux de DKK1 qu'ils considèrent au dessous des niveaux exprimés par une lignée cellulaire de sein normal, ce qui ne corrèle pas du tout avec ce que nous et d'autres avons montré (343). L'action suppressive de DKK1 qu'ils observent est indépendante de la voie canonique de Wnt, car elle ne mène pas à l'activité du facteur TCF. Il est quelque peu déplorable que ce groupe énonce des résultats allant à l'encontre de bien des faits rapportés dans la littérature et n'en discute pas. Il est vrai que ces observations sont faites à partir de seulement 2 lignées tumorales chez lesquelles, encore une fois, on provoque une expression forcée de DKK1. Sans invalider les résultats que ce groupe obtient, il est tout de même difficile d'ignorer l'observation, que nous avons démontré, de l'expression de DKK1 dans des échantillons cliniques de cancers du sein comportant un mauvais pronostic. Ces observations sont réalisées sur des échantillons cliniques n'ayant pas subi de culture et un minimum de manipulation.

Récemment, une étude a démontré que DKK1 augmentait le potentiel angiogénique des cellules endothéliales humaines pouvant former des colonies, ce qui a mené à l'investigation d'une influence de DKK1 dans l'angiogénèse tumorale. Les résultats de cette recherche ont montré que DKK1 était fortement exprimé dans les vaisseaux sanguins tumoraux (de cancer du sein) chez l'humain et ont aussi souligné une augmentation de la vascularisation ainsi que la grosseur des tumeurs dans un modèle de xénogreffe de cancer du sein humain chez la souris (344). Il est difficile d'établir un parallèle entre cette étude et la nôtre puisque la majorité des tumeurs auxquelles nous avons eu accès étaient très calcifiées et semblaient peu irriguées par les vaisseaux sanguins. Nous n'avons également pas obtenu de corrélation significative entre la taille des tumeurs que nous avons testées et l'expression de DKK1. Il faut cependant souligner encore une fois que, comme nous, cette étude laissait présager une corrélation entre l'expression de DKK1 et un mauvais pronostic dans le cancer du sein.

Il est tout de même surprenant de voir les discordances rapportées par certains groupes, tant qu'à la signification de l'expression de DKK1 dans le cancer du sein. Il semblerait que dépendamment du facteur sur lequel se concentre l'étude, les résultats qui en découleront pourront être différemment interprétés. Quoi qu'il en soit, notre étude démontrait clairement dans le cancer du sein l'expression de DKK1 (ARNm et protéine) dans un profil de tumeurs corrélant avec un mauvais pronostic, que ce soit en se basant sur le facteur du "triple négatif" ou du stade IIIc. La présence de DKK1 dans les cancers du sein agressifs demeure tout de même surprenante étant donné son rôle comme inhibiteur de la voie de Wnt.

Expression de DKK1 dans les cancers du poumon

Suite aux données recueillies par RT-PCR en temps réel, nous avons démontré l'expression de DKK1 dans des échantillons cliniques de tumeurs de cancer du poumon. Sur les 23 tumeurs testées, 11 tumeurs se sont avérées positives pour l'ARNm de DKK1. Nous n'avons pu générer de lysats tumoraux pour démontrer la présence de la protéine dans les échantillons cliniques. Nous avons toutefois mis en évidence la présence de la protéine DKK1 dans le milieu de culture d'une lignée cellulaire de cancer du poumon (H460), corrélant ainsi la présence de la protéine DKK1 avec celle de l'ARNm.

Nous n'avons fait aucune corrélation de l'expression de DKK1 avec les données clinico-pathologiques que nous avons à notre disposition, ceux-ci étant assez restreints pour les échantillons ne provenant pas du CHUM. Le seul paramètre que nous avons évalué après la publication de notre étude, est la consommation de tabac chez les patients. Cette évaluation a été réalisée suite à la publication d'une étude effectuée par *Hussain et al.* qui ont montré que les lignées cellulaires de cancer du poumon A549 et Calu-6 régulaient à la baisse l'expression de DKK1 après avoir été exposées à des doses de concentré de fumée de tabac équivalant à la consommation de 25 cigarettes par jour (345). La baisse d'expression de DKK1 n'engendrait aucun changement dans la capacité d'invasion de la

lignée A549, possédant à la base le caractère le plus agressif des 2 lignées. Par contre, chez Calu-6, la baisse de DKK1 provoquait une augmentation de son potentiel tumorigénique lorsqu'inoculée aux souris. La baisse de DKK1 n'était pas associée à une hyperméthylation du promoteur, comme observé dans le cancer du colon. Étonnement, *Hussain et al.* ont rapporté que la diminution de DKK1 chez la lignée Calu-6, suite à un traitement au concentré de fumée de tabac, coïncidait avec l'expression de la protéine Wnt-5a (345). La protéine Wnt-5a ne fait pas partie des molécules de Wnt associées à la voie canonique et a la capacité d'inhiber cette voie, lui conférant un rôle dans la suppression de la formation de certaines tumeurs. Wnt-5a pourrait, à l'opposé, présenter une activité pro-tumorale, par l'activation de la PCP, de JNK et une connexion avec la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme IL-6 et IL-8 (346-348). En résumé, cette étude démontrait que l'exposition à une concentration croissante de fumée de tabac diminuait l'expression de DKK1 chez 2 lignées de cancer du poumon, affectant le comportement tumorigénique d'une de ces lignées et coïncidant avec l'activation de la voie de Wnt non-canonique. Bien qu'intéressante, cette étude ne s'attardait pas au fait que la lignée la plus agressive ne partageait pas les mêmes effets observés suite à la diminution de DKK1. L'étude n'a pas non plus investigué l'expression de DKK1 dans les tumeurs provenant d'échantillons cliniques de patients atteints d'un cancer du poumon en corrélation avec leur consommation de cigarettes. Grâce à la disponibilité de cette donnée pour certains de nos patients, nous avons effectué cette corrélation et observé que l'expression de DKK1 semble plus élevée chez les patients fumeurs (Figure 19). Évidemment, notre échantillonnage restreint ne nous permet pas de tirer une conclusion finale, mais nous observons tout de même une discordance entre les observations chez la lignée cellulaire de cancer du poumon Calu-6 exposée à la fumée et nos échantillons cliniques provenant de fumeurs.

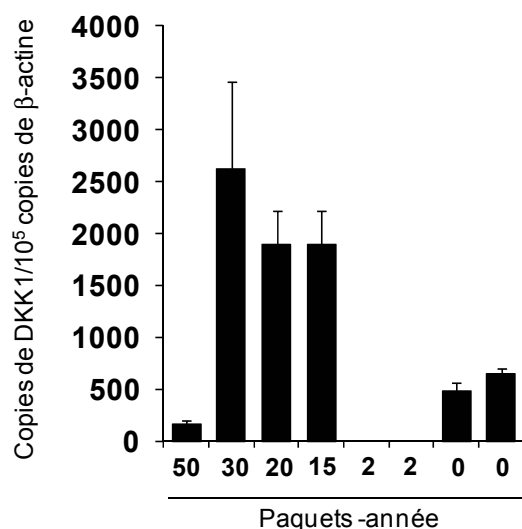


Figure 19. Expression de DKK1 dans les échantillons cliniques de tumeurs de cancer du poumon.

Légende : L'ADNc a été préparée à partir de l'ARNm extraite d'échantillons cliniques de tumeur de cancer du poumon (voir Materials and methods, SECTION 2). Une amplification par PCR en temps réel a ensuite été réalisée pour mettre en évidence l'expression de DKK1 avec l'utilisation de la β -actine comme gène de référence. Les résultats de l'expression de DKK1 dans les tissus tumoraux sont présentés en consommation dite "paquets-année". Selon le Dr. Jocelyne Martin, chirurgienne thoracique, la représentation de consommation "paquets-année" est calculée selon les exemples suivants : un fumeur de 2 paquets de cigarettes par jour pendant 2 ans = 4 paquets-année et un fumeur de 1 demi paquet par jour pendant 10 ans = 5 paquets-année.

Les discordances, entre l'expression de DKK1 dans le cancer du poumon rapportée par notre étude et les études publiées par la suite, se terminent avec les faits mentionnés ci-dessus. En effet, suite à la publication de nos résultats, d'autres groupes ont emboîté le pas et rapporté une expression de DKK1 dans le cancer du poumon corrélant

avec un mauvais pronostic. C'est le cas de l'étude menée par *Yamabuki et al.* dans le cancer du poumon et celui de l'œsophage (285). Ils ont premièrement démontré l'expression de DKK1 chez 48% des tumeurs de cancer du poumon (NSCLC) par marquage immunohistochimique sur un total de 279 échantillons cliniques. Ce pourcentage d'expression coïncide avec celui que nous avons obtenu dans notre étude. Un point très intéressant rapporté dans leurs études est qu'une forte expression de DKK1 corrélait avec une médiane de survie plus basse. Cette observation était également vraie pour le cancer de l'œsophage. Pour le cancer du poumon, *Yamabuki et al.* ont démontré que l'expression de DKK1 représentait un facteur de prédiction de pronostic indépendant, au même titre que le stade tumoral et l'atteinte ganglionnaire (285). Ils ont également rapporté que le niveau d'expression de DKK1, dans les lignées cellulaires de cancer du poumon et les échantillons cliniques, n'était pas proportionnel avec celui de son ligand, le LRP5/6. L'étude menée par *Sheng et al.* conclut, également qu'une concentration élevée de DKK1 sérique était associée avec un taux de survie diminué chez les patients atteints d'un cancer du poumon (349). Des conclusions semblables ont aussi été émises suite au dosage d'auto-anticorps dirigés contre DKK1 chez les patients atteints d'un cancer du poumon NSCLC (350).

Indépendamment du rôle que peut jouer DKK1 dans le développement et la progression du cancer du poumon, notre étude et celles d'autres groupes, ainsi que la corrélation avec un mauvais pronostic, confèrent à la détection de cette protéine, une perspective intéressante comme élément prédictif du degré d'agressivité du cancer. Il serait très intéressant d'investiguer l'expression de DKK1 dans les tumeurs secondaires au cancer du poumon, afin de permettre d'évaluer un lien possible avec le caractère invasif du cancer. Par contre, pour les patients atteints d'un cancer du poumon avec métastases, la chimiothérapie est préférée à la chirurgie, ce qui rend l'accès aux échantillons cliniques très difficile.

Expression de DKK1 dans les cancers du rein et autres

L'étude de la caractérisation d'un TAA potentiel pour le cancer du rein, le TGF- α , menée dans notre laboratoire par *Pelletier et al.* (351), nous a permis de quantifier l'expression de l'ARNm de DKK1, en nous donnant accès à 20 échantillons cliniques provenant de cancer du rein. Nous avons retrouvé l'expression de DKK1 dans 6 de ces échantillons. Encore une fois, notre étude ne s'est pas attardée à la corrélation de l'expression de DKK1 avec différents paramètres clinico-pathologiques, ceux-ci n'étant pas disponibles au moment de la publication de nos résultats.

Contrairement au cancer du sein et du poumon, la littérature concernant l'expression de DKK1 dans le cancer du rein ne s'est pas vraiment étoffée depuis la parution de notre étude. Dernièrement, une étude mentionnant le peu de connaissance sur le sujet est parue, rapportant DKK1 comme un possible gène suppresseur de tumeurs dans le cancer du rein. Cette étude, basée sur la surexpression forcée de DKK1 dans des lignées cellulaires de cancer du rein, rapportait une augmentation de l'apoptose chez les lignées affichant des transfectants stables de DKK1 (352). Cette surexpression de DKK1 n'engendrait pas de changements dans les niveaux de β -catenin et du facteur TCF, mais corrélait plutôt avec les l'expression de p53 et p21. Cette observation est plutôt surprenante, puisqu'il a été démontré que p53 pouvait agir sur l'expression de DKK1 seulement en présence d'une voie de Wnt active et suite à l'expression de DKK1 cette voie s'en trouvait inhibée (338). Encore une fois, il s'agit ici d'une étude réalisée sur des lignées cellulaires et non des échantillons cliniques. Une étude par marquage immunohistochimique sur des tissus provenant d'échantillons cliniques de cancer du rein, investiguant l'expression de DKK1, β -catenin, TCF, p53 et p21, pourrait permettre une analyse de base plus intéressante pour ensuite raffiner l'exploration selon les différents phénotypes obtenus quant au pronostic.

DKK1 comme marker biologique et outil de pronostic

Ainsi, suite à la publication de notre étude, un bon nombre de groupes de recherche ont exploré l'expression de DKK1 dans différents cancers et corréler son expression avec un mauvais pronostic. Suite au rapport de l'expression de DKK1 corrélié avec un mauvais pronostic dans les cancers du poumon, de l'œsophage, du pancréas, du foie et dans le gliome, il a été proposé que DKK1 soit considéré comme outil de pronostic ((288, 291, 349, 353, 354). Le marquage de DKK1, dans les étalages sur lame de tissus tumoraux réalisés en pathologie, peut être une méthode utilisée pour mettre en évidence la présence de la protéine et ainsi prédire l'évolution de la maladie comme il a été proposé dans le cancer de l'œsophage (353). DKK1 étant une protéine sécrétée, l'intérêt pour sa détection est d'autant plus grand, puisqu'il permet d'envisager sa détection directement dans le sérum du patient. La quantité de DKK1 dans le sérum a été associée avec le stade clinique dans les cancers gynécologiques et avec le type histologique ainsi que la présence de métastases ganglionnaires dans le cancer du col de l'utérus (355). Dans le neuroblastome, la détection de DKK1 dans le plasma a tout récemment été proposée comme outils de prédiction de résistance à la chimiothérapie corrélant ainsi avec un mauvais pronostic chez les patients (356). Cette étude n'a cependant pas démontré l'utilisation de DKK1 dans la prédiction de métastases osseuses comme il a été proposé dans le myélome multiple (284).

Dans le cadre de certains essais cliniques réalisés dernièrement pour le myélome multiple, DKK1 fait partie des paramètres mesurés pour évaluer la réponse au traitement. Ainsi, pour ce cancer, DKK1 est considéré comme un marker biologique et une diminution de DKK1 sérique est considéré comme indication d'une réponse au traitement (357, 358).

Concernant le cancer du sein, comme les études sont mitigées sur le rôle de DKK1, il n'a pas été clairement proposé dans la littérature comme un marqueur de pronostic. Cependant, indépendamment de l'implication de DKK1 dans le cancer du sein, notre étude

démontre tout de même qu'il semble y avoir un parallèle entre son expression et les tumeurs présentant un caractère agressif.

5.1.2 Perspectives et conclusions

DKK1 pourrait-il être utilisé comme outil pronostic dans les cancers communs?

Notre étude rapportant l'expression de DKK1 dans les échantillons cliniques provenant de tumeurs de cancer du sein et du poumon a été menée dans l'optique d'une première étape dans la validation de DKK1 comme TAA potentiel pour les cancers communs. Cette première étape consistait en la démonstration que DKK1 était exprimé au niveau des tissus tumoraux et absent des tissus normaux dérivés d'organes importants. Il est évident qu'étant donné le champ de recherche de notre laboratoire, l'immunothérapie tumorale constituait notre priorité. Cependant, lorsqu'il est question de la comparaison de l'expression d'une même protéine dans les différents tissus cancéreux, tout en établissant une corrélation de cette expression avec certaines signatures phénotypiques ou de pronostic, on ne peut ignorer la possibilité d'utiliser cette protéine comme marqueur tumoral.

Un marqueur tumoral représente une altération ou une déviation d'une molécule ou d'une substance, retrouvée lors d'un état malin. Ce changement par rapport à l'état normal peut être qualitatif ou quantitatif et détecté par différents essais (359). Les marqueurs tumoraux peuvent être utilisés comme outils de prédiction de pronostic, mais peuvent aussi influencer le choix de traitement administré au patient. Ainsi, l'utilisation d'un marqueur tumoral, dont la fiabilité est questionnable, peut engendrer la prise de décisions cliniques inadéquates et exposer le patient à des conséquences diverses, comme l'exposition à la toxicité d'un traitement non nécessaire. Pour déterminer l'utilité clinique d'un marqueur tumoral, il est important de désigner son potentiel d'utilisation et être capable d'associer le résultat de l'essai du marqueur avec le résultat biologique attendu. Un marqueur peut également être utilisé comme outil différentiel de diagnostic, comme évaluateur de risques

et pour prédire le déroulement d'un essai clinique (359). Les marqueurs tumoraux peuvent être sériques ou tissulaires.

Dans le cancer du poumon, les différentes publications parues, suite à notre étude et discutée à l'instant, tendent déjà vers l'utilisation de DKK1 comme outils pronostic pour ce cancer. Avant de considérer l'intégration de l'analyse de l'expression de DKK1, au CHUM par exemple, il serait important de reproduire les résultats rapportés dans les autres études pour s'assurer que les conclusions s'appliquent à notre cohorte. Nous ne possédons pas les données quant à la survie des patients. Cependant, comme le cancer du poumon affiche un taux de survie de 15% en 5 ans, il sera possible d'attribuer le décès du patient au cancer plutôt qu'à une cause autre. Pour le cancer du sein, ceci est moins évident, puisque l'information se rapportant à la cause du décès est disponible pour certaines patientes seulement. La corrélation entre le décès de la patiente des suites de son cancer et l'expression de DKK1 au niveau de la tumeur serait intéressante.

Les données d'expression de DKK1 chez 50% des tumeurs triples négatives sont déjà très intéressantes. Ainsi, il serait pertinent d'évaluer si cette tendance se maintient en élargissant la cohorte par une analyse par micro-étalage de tissus (*tissus array*), donnant accès à une centaine de tissus de cancers du sein, rendus disponibles par la banque de cancer du sein du CHUM-FRSQ, qui est établi dans notre laboratoire. La détection de DKK1 par marquage immunohistochimique permettrait de répondre rapidement à cette question. Il serait également pertinent de faire une analyse similaire pour la détection de DKK1 dans les coupes tissulaires de ganglions axillaires, positifs pour la présence de métastases et dont la tumeur primaire exprime DKK1. L'expression de DKK1 dans ces ganglions pourrait ajouter au caractère invasif accompagnant des tumeurs primaires exprimant DKK1.

L'élaboration d'un micro-étalage de tissus pour le cancer du poumon et sein, permettant le marquage par immunohistochimie de DKK1, représenterait une méthode

rapide pour l'évaluation du potentiel de DKK1 comme marqueur pronostic dans ces 2 cancers, pour une étude à plus grande échelle.

DKK1 dans les cancers communs, inhibiteur de la voie de Wnt canonique ou non?

Cette thèse n'a pas pour ambition de répondre à cette question. Les études ayant abordé la question sont mitigées et diffèrent selon le type de cancer visé et le choix des lignées cellulaires étudiées. Cependant, le marquage par immunohistochimie de DKK1, dans les échantillons cliniques de cancers du sein et du poumon, pourrait également être pertinent dans l'évaluation de l'expression de protéines pouvant permettre d'éclaircir la question. Par exemple, un marquage tissulaire des tumeurs montrant l'expression de DKK1 et celle de la β -catenin, au cytoplasme et au noyau, témoignerait d'une voie canonique de Wnt activée et donc, d'un DKK1 inactif pour son rôle d'inhibiteur dans les échantillons cliniques. Le marquage pourrait également inclure la protéine Wnt-5a dont l'expression s'est révélée augmentée, suite à la diminution de DKK1 induite dans la lignée cellulaire du cancer du poumon Calu6 (345). La mise en évidence de Wnt-5a dans les échantillons cliniques pourrait permettre de valider ou invalider une observation, qui pour l'instant, ce restreint à une lignée cellulaire. Wnt-5a pouvant inhiber la voie canonique de Wnt et étant impliquée dans l'activation des voies non-canoniques, l'évaluation de son expression et celle de DKK1 pourrait lancer quelques pistes intéressantes.

L'évaluation de l'expression de la protéine Mesd serait également pertinente à combiner à celle de DKK1 dans les cancers. Mesd est une protéine chaperonne essentielle au bon repliement du récepteur LRP5/6 (360). En absence de Mesd, LRP5 et LRP6 forment des agrégats et n'atteignent jamais la surface de la cellule (361). La chaperonne Mesd peut lier le LRP6 mature à la surface de la cellule et empêcher la liaison de DKK1, comme démontré par *Li et al* (362). Mesd et DKK1 partagent le même site de liaison pour LRP5/6. Ce groupe a cependant démontré que, lorsque mis en situation de compétition pour la liaison du récepteur, DKK1 et la Sclerostin, une autre protéine pouvant inhiber la voie de

Wnt en liant le récepteur LRP5/6, l'emporte sur Mesd (363, 364). Ils ont aussi démontré une inhibition de la voie de Wnt lorsque la lignée cellulaire de cancer de la prostate PC3 (DKK1⁺) est mise en présence de Mesd exogène (363). Il n'y a rien dans la littérature rapportant l'expression de Mesd ou de la Sclerostin dans les échantillons cliniques de cancers. Il serait donc pertinent de joindre ces protéines à l'étude immunohistochimique des micro-étalages de tissus de cancers du sein et du poumon, car la présence de l'une ou l'autre de ces protéines pourrait supposer une compétition pour la liaison de DKK1 pour son récepteur dans les cancers.

Finalement, en regard à l'utilisation de DKK1 comme TAA, cette étude a permis de franchir positivement les premières étapes dans la validation concernant son profil d'expression. DKK1 est exprimé dans les échantillons cliniques de patients présentant des profils particuliers de tumeurs de cancer du sein et chez 50% des cancers du poumon. Cependant, avant de valider la candidature de DKK1 comme TAA, nous devons explorer son immunogénicité chez les patients atteints d'un cancer commun. Cette partie du travail sera discutée dans le prochain point (5.2).

5.2 Étude de la polyfonctionnalité d'un clone de lymphocyte T CD8⁺, spécifique à DKK1, isolé d'un patient atteint d'un cancer du poumon

5.2.1 Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats

Suite à la démonstration de l'expression de DKK1 dans les cancers communs du sein et du poumon et son absence presque totale des tissus normaux, en particulier ceux provenant d'organes importants, nous avons procédé à la détermination de son immunogénicité. Comme il a été discuté précédemment (SECTION 1, point 1.3.1), l'immunogénicité se définit comme la capacité de déclencher une réponse du système immunitaire, cellulaire ou humorale. Ainsi, comme cette étude se concentre sur l'amélioration de l'immunothérapie à médiation cellulaire, nous avons évalué l'immunogénicité de DKK1 par la reconnaissance des T CD8⁺.

Comme il a été discuté auparavant (SECTION 1, point 1.5.1), il existe différentes approches pour identifier les peptides découlant de protéines comme les TAA, pouvant être présentés par HLA d'un CMH-I d'un produit allélique en particulier. Pour identifier les peptides de DKK1 pouvant être présentés par CMH-I, nous avons exploité les algorithmes de prédiction peptidique des Dr. KC. Parker et Dr. HG. Rammensee. Comme mentionné plus tôt, ces algorithmes sont basés sur la présence de motifs consensus permettant de prédire la liaison probable de peptides à certaines allèles de HLA avec une plus grande affinité (257, 258). Nous avons sélectionné les peptides DKK1 prédits pour être présentés par CMH-I HLA-A*0201, l'allèle la plus fréquente dans la population générale (avec certaines exceptions comme les populations asiatiques et africaines) (365). Nous avons raffiné davantage la sélection des peptides avec l'utilisation de l'algorithme de prédiction de clivage par protéasome, PProC (259). Une liste de 15 peptides de DKK1, entre 9 et 10 a.a. de taille, ont été synthétisés (Table I^{m2}). Ces peptides ont ensuite été utilisés dans la stimulation des PBMC de patients atteints d'un cancer commun, dans le but de réaliser l'expansion de T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement ces peptides. Des clones de T CD8⁺ spécifiques au peptide 20 de DKK1 ont été isolés chez les patients atteints d'un cancer du

poumon et du sein. Une étude détaillée de la polyfonctionnalité a pu être réalisée pour un des clones isolés dans le cancer du poumon. Le profil de sécrétion de ce clone a révélé une tendance vers des cytokines impliquées dans une réponse cellulaire anti-tumorale favorable (IP-10, IFN- γ , MIP-1 β , GM-CSF, MIP-1 α , IL-2 et granzyme B) (Figure 1^{m2}B et C).

Cette étude concluait sur la mise en évidence d'un profil effecteur de type Th1, retrouvé chez un clone de T CD8⁺ spécifique à DKK1, isolé d'un patient atteint d'un cancer du poumon. Les cytokines sécrétées par ce clone étaient sensiblement les mêmes que celles sécrétées par des T CD8⁺ (spécifiques à d'autres TAA), retrouvés chez des patients atteints d'un cancer du poumon, suite à une vaccination peptidique. Ces patients étaient considérés comme des "survivants à long terme". Ainsi, cette similarité dans le profil de cytokine permet d'envisager de façon positive une vaccination peptidique avec le peptide 20 de DKK1.

Évaluation de l'immunogénicité de DKK1

S'inscrivant dans une démarche d'évaluation de l'immunogénicité, les peptides synthétiques de DKK1 ont été utilisés en stimulations *in vitro* de PBMC de patientes atteintes d'un cancer du sein et de patients atteints d'un cancer du poumon (260). Le but de ces stimulations était de faire proliférer des T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement un peptide de DKK1, afin de caractériser le type de réponse immune qu'ils produisent et explorer les possibilités d'utilisation clinique. Le Tableau III représente une rétrospective de la majorité des stimulations effectuées chez les patients atteints des 2 types de cancers à l'étude. Il est à noter que, dû à une restriction dans la quantité de PBMC disponibles pour chaque patient, seulement 5 des 15 peptides initiaux de DKK1 ont été utilisés dans ces stimulations. Le protocole de stimulations *in vitro* de PBMC s'échelonne sur environ 1 mois et est détaillé à la Figure 20 (366). L'aboutissement de ce protocole est l'expansion de lignées primaires de lymphocytes T reconnaissant spécifiquement un peptide de DKK1. Ces lignées lymphocytaires sont considérées comme hétérogènes, constituées de T CD8⁺

dirigés spécifiquement contre le peptide d'intérêt avec lequel ils ont été stimulés, mais également constituées de lymphocytes dont la prolifération non-spécifique est attribuable à l'ajout de cytokines. Un clonage par dilutions limites représente donc l'étape suivante, afin d'isoler des clones de cellules T CD8⁺ spécifiques aux peptides de DKK1 pour mieux les caractériser (320). Un sommaire des résultats obtenus suite à ces stimulations est présenté au Tableau III.

Cancers	Patient(e)s	Lignées spécifiques à un peptide de DKK1	Clones testés	Clones spécifiques
Sein	- P474	- 1 lignée peptide 20	- Aucun	
	- P480	- 1 lignée peptide 36	- 123	- Aucun
	- P482	- Aucune		
	- P488	- 1 lignée peptide 20	- 64	- Aucun
		- 1 lignée peptide 182	- 310	- Aucun
	- P500	- 1 lignée peptide 20	- 123	- 1
	- P550	- Aucune		
	- P560	- 2 lignées peptide 68	- 134 - 360	- Aucun - Aucun
Poumon	- P11	- 2 lignées peptide 20	- 150 - 141	- 3 - Aucun
	- P12	- Aucune		
	- P16	- 1 lignée peptide 20	- 67	- Aucun
		- 1 lignée peptide 36	- 111	- Aucun

Les patient(e)s atteint(e)s d'un cancer du sein ou du poumon dont les PBMC ont été utilisés pour être stimulés *in vitro* avec les peptides synthétiques de DKK1 (20, 36, 182, 68 et 61). La spécificité des lignées a été évaluée par ELISPOT IFN- γ (5 lignées par peptide) et celles des clones, par ELISA IFN- γ . Dix spots et le double de spots obtenus pour le contrôle négatif était considéré un résultat positif pour l'ELISPOT et une sécrétion supérieure à 50 ng/mL et le double du contrôle négatif pour l'ELISA.

Tableau III. Liste des patient(e)s de cancer commun dont les PBMC ont été stimulés *in vitro* avec les peptides synthétiques de DKK1 et sommaire des résultats

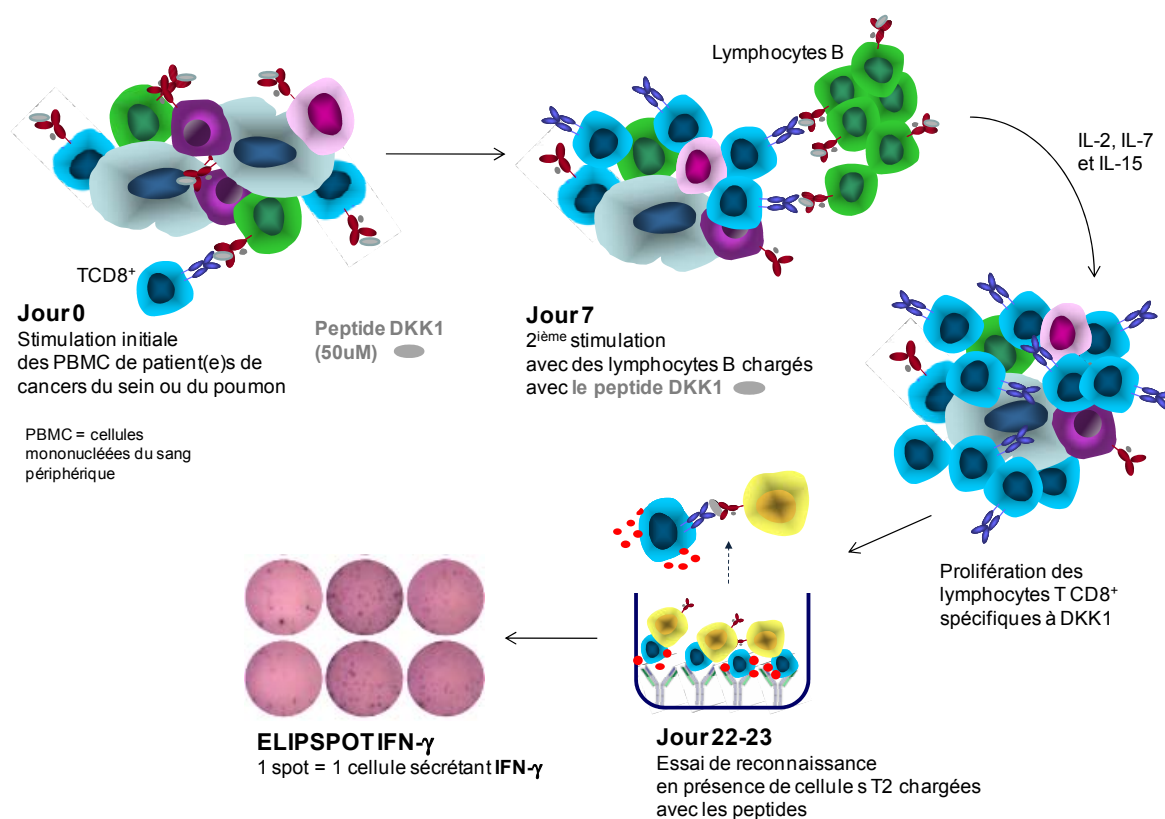


Figure 20. Méthodologie des stimulations de PBMC de patients avec les peptides synthétiques de DKK1

Légende : **Jour 0** Les PBMC sont isolés du sang complet des patients atteints d'un cancer du poumon ou du sein (HLA-A*02) grâce à une séparation par gradient de concentration et mis en culture dans des plaques de 96 puits (5 puits par peptide). Une concentration de 50 μ M de peptide synthétique de DKK1 est ajoutée aux cultures. Les peptides possédant une bonne affinité pour les CMH-I pourront se charger directement sur les molécules exprimées à la surface des PMBC pour être présentés aux T CD8⁺ et activer ces derniers. La molécule de co-stimulation CD40-ligand soluble (CD40Ls) est ajoutée aux cultures pour augmenter l'activation. En parallèle, des cultures de lymphocytes B autologues sont débutées à partir de PBMC stimulés avec du CD40Ls et de l'IL-4 (CD40-B). **Jour 7** Les cultures de CD40-B sont utilisées comme APC. Les CD40-B sont chargés 3 heures en présence des différents peptides de DKK1, puis ajoutés aux cultures de PBMC. Les

peptides seront ainsi présentés aux T CD8⁺ pour une 2^{ème} fois. Les cytokines IL-2, IL-7 et IL-15 sont ajoutées le lendemain et dans les 5 jours suivant pour aider à la prolifération des lymphocytes. **Jour 22-23** La spécificité des lignées de lymphocytes ayant proliférées est évaluée sur la base de sécrétion d'IFN- γ , par *Enzyme-Linked Immunospot Assay* (ELISPOT), avec les cellules T2 chargées avec les peptides de DKK1 ou le peptide g209 du TAA gp100 (contrôle négatif). Chaque spot observé sur la membrane de la plaque d'ELISPOT correspond à un T CD8⁺ ayant sécrété de l'IFN- γ .

Le pourcentage de réussite dans l'isolement de clones de T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement un peptide de DKK1 s'est avéré plus bas que pour un peptide d'origine viral, tel que présenté dans le manuscrit en ANNEXE II. Comme le montre le Tableau III, très peu de clones spécifiques à DKK1 ont été isolés, si l'on tient compte du nombre de patients utilisés dans cette étude. Plusieurs possibilités peuvent être envisagées pour expliquer cette différence observée dans le degré de difficulté d'isolement de clones spécifiques aux peptides viraux et tumoraux.

Premièrement, DKK1 étant une protéine dite "du soi", l'on pourrait supposer que la fréquence de T CD8⁺ dans le sang circulant, dirigés contre cette protéine, soit très faible; fait attribuable, entre autre, à la sélection négative que doivent subir les lymphocytes T dans le thymus. La sélection négative effectuée a pour but l'élimination des T CD8⁺ démontrant une forte affinité par les antigènes "du soi". Il est donc justifié de penser que les lymphocytes n'ayant pas été éliminés se retrouvent en faible quantité dans la circulation et que ces derniers possèdent un TCR de faible affinité (19). Cependant, comme le montre la Figure 2^{ml} (A, B et C), l'expression de DKK1 n'a pas été observée dans le thymus, ce qui pourrait laisser supposer qu'il ne participe pas à la sélection négative, ceci n'étant qu'une hypothèse. Même si DKK1 était retrouvé dans le thymus, comme c'est le cas pour les TAA NY-ESO-1 et MAGE, il serait tout de même possible de retrouver des T CD8⁺ spécifiques dans le sang circulant, comme il a été montré pour ces 2 TAA (367).

En fait, nous n'avons pas eu la possibilité d'évaluer la fréquence des T CD8⁺ spécifiques aux peptides de DKK1 dans le sang circulant de patients. L'utilisation de tétramères aurait été une bonne stratégie. Nous avons évalué la fréquence directement par *Enzyme-Linked Immunospot Assay* (ELISPOT) IFN- γ , en mettant les PBMC des patients en présence des peptides de DKK1, sans toutefois obtenir de résultats concluants. Pour ce qui est de la question de l'affinité du TCR des lymphocytes ayant échappés à la sélection négative dans le thymus, comme le montre la Figure 21, le clone de T CD8⁺ reconnaissant le peptide 20 de DKK1, isolé chez une patiente atteinte d'un cancer du sein, possède un TCR capable de reconnaître le peptide à une concentration 100 fois plus faible que celle utilisée en stimulation. L'affinité ne semble donc pas présenter un problème, du moins pour ce peptide.

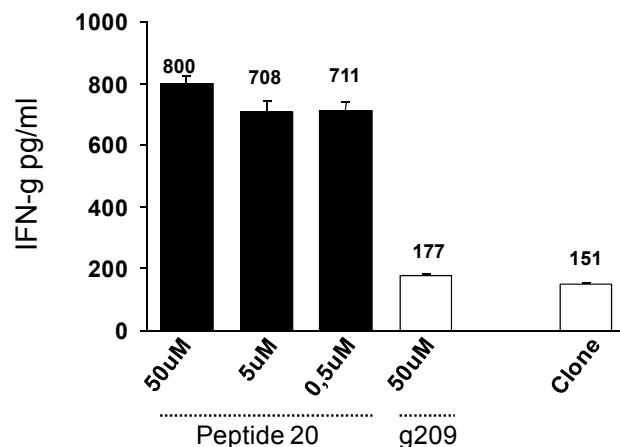


Figure 21. Sécrétion d'IFN- γ d'un clone de T CD8⁺, isolé d'une patiente atteinte d'un cancer du sein, suite à la reconnaissance du peptide 20 de DKK1 à des concentrations décroissantes

Légende : Essai de reconnaissance d'un clone de T CD8⁺, isolé d'une patiente atteinte d'un cancer du sein, suite à une technique de dilutions limites. La reconnaissance du clone pour le peptide 20 de DKK1 est évaluée selon différentes concentrations du peptide, préalablement chargé 3 heures sur la lignée lymphocytaire T2. La reconnaissance du peptide par le clone est évaluée selon sa sécrétion d'IFN- γ , par une méthode *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Le g209 est utilisé comme contrôle négatif ainsi que le clone seul pour établir la sécrétion basale.

Le peptide 20 de DKK1 semblait le plus prometteur en terme de présentation par CMH-I. Ce peptide affichait le meilleur rendement selon les 2 algorithmes de prédiction (Table I^{m2}). Le peptide 20 de DKK1 est également le peptide ayant engendré la plus grande augmentation de l'expression des CMH-I HLA-A*0201, à la surface de la lignée des cellules T2, avec une performance surpassant celle du peptide contrôle d'Her2/*neu* (muté ou non) et rejoignant presque celle du peptide bien défini de la protéine M1 du virus

influenza (Table I^{m2} et Online resource 1^{m2}) (368, 369). Bien que la performance des autres peptides de DKK1 dans les essais de stabilité de CMH-I ne fût pas aussi convaincante que celle du peptide 20, des lignées de lymphocytes T spécifiques aux peptides 36, 182 et 68 ont aussi été générées à partir des PBMC des patients atteints d'un cancer du poumon et du sein, mais l'isolement de clones n'a pas été possible (Table I^{m2}).

Au cours de ce projet de doctorat, d'autres techniques ont été explorées pour démontrer l'immunogénicité de DKK1. Des stimulations de PBMC avec la protéine recombinante de DKK1 (en remplacement des peptides synthétiques) ont été réalisées. Comme la protéine comportait un étiquette (la glucathione S-transférase (GST)) permettant sa purification, le résultat des stimulations fût des lignées primaires de lymphocytes présentant une spécificité pour l'étiquette et non pour DKK1. Les PBMC de certaines patientes ont également été stimulés *in vitro* avec des lymphocytes B stimulés au CD40-ligand (CD40-B) transfectés (par électroporation) avec un plasmide contenant la séquence de DKK1 encadrée ou non par les séquences signale et terminal de la protéine gp100. Ces séquences permettent le cheminement de la protéine dans les endosomes pour ensuite être dégradée et présentée par CMH-II, sans affecter la présentation par CMH-I (370). Cette stratégie, développée dans notre laboratoire, aurait permis la stimulation simultanée de T CD8⁺ et de T CD4⁺ spécifiques à DKK1, par une même APC. Nous n'avons cependant pas pu démontrer la production de cette construction protéique et faute de résultats, ce type de stimulations n'a pas été développé davantage.

Pour conclure avec l'immunogénicité de DKK1, l'isolement de clones spécifiques à DKK1 n'a pas été réalisé avec une grande facilité, mais a tout de même pu être menée à terme pour un des peptides de DKK1, le peptide 20. La protéine DKK1 comporte donc au moins 1 peptide immunogène. Il aurait été intéressant d'évaluer la fréquence de T CD8⁺ spécifiques à ce peptide dans le sang des patients atteints d'un cancer du poumon ou du sein. Il a été démontré par *Quian et al.* que les patients atteints d'un myélome multiple possèdent entre 2 et 4% de T CD8⁺ reconnaissant le peptide 20 de DKK1, comparativement à 0,5%, chez les donneurs normaux (371). Il serait intéressant de faire ce type de

comparaison avec le cancer du poumon et celui du sein ainsi que la corrélation entre la positivité de la tumeur pour l'expression de DKK1 et la fréquence ou encore la facilité à générer des lignées de lymphocytes spécifiques au peptide. Une exposition prolongée à un antigène peut amener une tolérance du système immunitaire, une anergie des lymphocytes. Cette tolérance peut toutefois être brisée (19). Une question demeure également non résolue en ce qui concerne les autres peptides de DKK1, pour lesquels nous avons réussi à générer des lignées spécifiques, mais pas obtenu de succès dans l'isolement de clones. L'utilisation de tétramère pour isoler les T CD8⁺ spécifiques à ces peptides, si la quantité de ces cellules dans le sang périphérique le permet, pourrait faciliter leur caractérisation.

La polyfonctionnalité des lymphocytes T en immunothérapie du cancer

Comme il a été mentionné, *Quian et al.* ont identifié des T CD8⁺ reconnaissant spécifiquement le peptide 20 de DKK1 dans le sang circulant de patients atteints d'un myélome multiple. Ils ont donc été les premiers à faire l'identification de ce peptide (371). Ils ont également obtenu des clones de T CD8⁺ dirigés spécifiquement contre le peptide 20, avec l'utilisation d'une technique de stimulation *in vitro*, semblable à celle utilisée pour notre étude, à la différence qu'ils ont utilisé des DC au lieu des CD40-B comme APC. *Quian et al.* ont entrepris la caractérisation de leur clone par l'évaluation de la sécrétion des 2 cytokines normalement utilisées pour différencier un lymphocyte appartenant à la réponse de type Th1 ou Th2, soit l'IFN- γ (Th1) et l'IL-4 (Th2). Ils ont démontré qu'en présence du peptide 20, leur clone de T CD8⁺ sécrétait de l'IFN- γ et très peu d'IL-4, laissant supposer d'un profil Th1. L'inconvénient de ce type de caractérisation basée sur l'évaluation de 2 cytokines est qu'il est restrictif et ne permet pas de tirer de conclusions plus poussées quand au potentiel d'action des lymphocytes. L'établissement du portrait de l'ensemble des cytokines qu'un lymphocyte peut sécréter, suite à une stimulation par son TCR, permet de prévoir l'impact qu'aura cette stimulation sur le lymphocyte lui-même, mais également sur son environnement et les autres cellules s'y retrouvant. Cette capacité que possède un

lymphocyte à effectuer plusieurs tâches effectrices, grâce aux cytokines, chimiokines et enzymes cytolytiques qu'il produit se nomme la polyfonctionnalité.

Les études récentes en virologie ont démontré l'importance de la polyfonctionnalité dans l'élimination d'une infection et le maintien de la protection. Les différents modèles de vaccination virale ont d'ailleurs révélés une corrélation entre le nombre de cytokines Th1 qu'un T CD8⁺ peut sécréter et une réponse anti-virale efficace (372, 373). Les cytokines normalement évaluées dans ce type d'étude sont l'IL-2, l'IFN- γ , le TNF- α et la protéine inflammatoire du macrophage 1 (MIP-1) β . L'évaluation est habituellement faite par cytométrie en flux, ce qui donne l'avantage de pouvoir visualiser l'expression de ces cytokines chez une même cellule, mais amène également l'inconvénient de restriction dans le nombre de cytokines pouvant être étudié simultanément. Ainsi, l'arrivée des analyses de cytokines par essai multiplex a permis d'élargir la caractérisation à plus de 20 cytokines et ce de façon quantitative.

Bien que la vaccination en virologie ait intégré l'importance de l'étude de la polyfonctionnalité dans la prédiction de la qualité de la réponse immune en réponse aux vaccins, l'immunothérapie de cancer tarde encore à adopter ce concept. Dans cette optique, nous avons orienté l'étude de l'immunogénicité de DKK1 vers l'étude de la polyfonctionnalité des T CD8⁺ spécifiques au peptide. Nous croyons que cette étude pourrait ainsi permettre de prédire le type de réponse immunitaire à médiation cellulaire produite suite à une vaccination comportant le peptide 20 de DKK1. Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé le clone de T CD8⁺, isolé chez un patient atteint d'un cancer du poumon, spécifique au peptide 20 de DKK1. Ce clone, produit par dilutions limites, a été identifié par ELISA IFN- γ dont les résultats de sécrétion sont présentés à la Figure 1^{m2}A (gauche). Le surnageant de cet ELISA a ensuite été évalué pour la présence de 26 autres cytokines en essai multiplexe. Cet essai a révélé un profil de lymphocytes T effecteurs de type Th1, par la présence des cytokines IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α , IFN- γ , IL-2 et GM-CSF (Figure 1^{m2}B). L'utilité de chacune de ces cytokines, dans une optique d'immunothérapie du cancer, est discutée à la SECTION 3 (Discussion) et ne sera pas reprise ici. Nous

résumerons seulement les points favorables que la sécrétion de ces cytokines apporte, soit une activité anti-tumorale, une aide à la formation d'une réponse mémoire, le recrutement de cellules immunitaires et l'activation des APC. Dans le cadre de cette étude, nous avons aussi mis en évidence, par cytométrie en flux, la présence de la sérine protéase granzyme B à l'intérieur de cytoplasme du clone de T CD8⁺ (Figure 1^{m2}C). La présence de granzyme B représente une indication du pouvoir cytotoxique de ce clone, le granzyme B étant capable d'induire une mort rapide par apoptose de la cellule ciblée (19). Évidemment, le pouvoir cytotoxique de ce clone se doit d'être confirmé par un essai de lyse où le clone, mis en présence de cellules présentant le peptide 20 (en complexe avec le CMH-I), engendrerait la mort de ces dernières. La démonstration de l'expression de la perforine aurait aussi été une donnée additionnelle intéressante, puisque cette molécule permet la création d'un pore pour faciliter la pénétration du granzyme à l'intérieur de la cellule cible (19).

Comme rapporté par *Qian et al.* dans le myélome multiple, notre clone T CD8⁺ spécifique au peptide 20 (Figure 1^{m2}A), que nous avons isolé chez un patient atteint d'un cancer du poumon, ne sécrète pas d'IL-4 (Figure 1^{m2}B) (371). L'avantage que présente notre étude, en comparaison avec celle de *Qian et al.*, est que nous rapportons aussi l'absence de sécrétion d'IL-10 (Figure 1^{m2}B), laissant présager que ce clone ne possède pas de profil inhibiteur, du moins pas de capacité d'inhibition indépendante de contact, puisque nous n'avons pas eu la chance d'investiguer l'expression de CTLA-4 chez ce clone (82, 83, 85).

Un autre fait intéressant dans notre étude, est la présence des cytokines IL-5 et IL-13, révélée par l'analyse multiplexe (Figure 1^{m2}B). Comme mentionné dans la SECTION 1 au point 1.2.2.1, ces 2 cytokines sont normalement considérées, avec l'IL-4, comme associées à la réponse Th2. Encore une fois, est soulignée l'importance de l'étude de la polyfonctionnalité, car l'investigation unique de l'IL-4 n'aurait pas révélé ce trait particulier de notre clone. La littérature est surtout rattachée à une sécrétion produite par les T CD4⁺, quant à l'impact de l'IL-13 dans le cancer. Cette production a été rapportée par le groupe des Dr. J. Banchereau et Dr. AK. Palucka comme facilitant le développement

tumoral, notamment dans le cancer du sein (374). Une autre étude menée dans notre laboratoire a montré que l'IL-13 sécrété par les T CD4⁺ et les T CD8⁺, pouvait inhiber l'expression d'IDO par les cellules tumorales (entre autre du sein) et ainsi protéger d'un mécanisme de suppression de la réponse immunitaire (327). L'action de l'IL-13 dans le cancer est donc questionnable; les réponses résident peut-être dans le moment où la sécrétion est effectuée et dans le ratio des différentes cytokines présentes au moment de cette sécrétion. Finalement, le rôle de l'Il-5 dans l'immunité anti-tumorale n'est pas très clair. Il a récemment été démontré que l'Il-5 pourrait être impliqué dans le recrutement des éosinophiles, dans l'environnement tumoral, suite à sa sécrétion par les cellules tumorales (375). Il a d'ailleurs été proposé très récemment par *Eftimie et al.* que le recrutement de éosinophiles et la réponse Th2 pourrait aider la réponse immunitaire anti-tumorale et le rejet de la tumeur (376). Une étude récente chez des patients atteints d'un cancer du poumon, ayant reçu des vaccins peptidiques de différents TAA (K-ras, le récepteur II du TGF- β et la transcriptase inversée de la télomérase humaine), a montré la présence de clones de T CD8⁺ spécifiques à ces TAA sécrétant de l'IL-5 et de l'IL-13 (377). Cette étude menée par *Kyte et al.* a montré que ces clones retrouvés chez les survivants à long terme du cancer du poumon, sécrétaient, en plus de ces 2 cytokines, de l'IFN- γ . Ces clones T CD8⁺, qu'ils considèrent comme des cellules mémoires, ne sécrètent pas d'Il-4 et d'IL-10 et présentent donc un profil de polyfonctionnalité très similaire au clone spécifique au peptide 20 de la protéine DKK1 que nous avons caractérisé dans le cancer du poumon.

Notre étude portant sur la polyfonctionnalité d'un clone de T CD8⁺, spécifiquement dirigé contre un peptide de la protéine DKK1, témoigne de la plasticité des lymphocytes. La sécrétion d'une majorité de cytokines se rattachant à un type particulier de réponse immunitaire peut laisser présager que la cellule s'engagera dans ce type de réponse *in vivo*, mais n'exclut pas la possibilité qu'elle produise également d'autres cytokines appartenant à une autre branche de la réponse. Les résultats de cette étude, comparés avec ceux obtenus dans l'étude de *Kyte et al.* chez les survivants à long terme, suite à une vaccination

peptidique effectué dans le cancer du poumon, permettent d'envisager avec positivisme la suite des expériences menant à la validation de DKK1 comme TAA.

5.2.2 Perspectives et conclusions

Utilisation de DKK1 comme TAA en immunothérapie du cancer

Notre étude n'a pu faire la démonstration que le peptide 20 de DKK1 était présenté de façon naturelle à la surface des lignées cellulaires de cancer positives pour l'expression de la protéine. Cette démonstration aurait pu être réalisée grâce à la reconnaissance spécifique, par notre clone de T CD8⁺, des lignées tumorales exprimant DKK1 et HLA-A*0201. Nous avons tout de même des indications de la présentation naturelle du peptide 20 par les CMH-I HLA-A*0201, suite aux essais de reconnaissance effectués par *Qian et al.*, montrant une lyse spécifique de lignées cellulaires de myélome multiple positives pour l'expression de DKK1 et HLA-A*0201 (371). Il est évident qu'il est capital dans notre démarche pour valider DKK1 comme antigène tumorale pour les cancers communs, de démontrer qu'un clone de T CD8⁺ spécifique au peptide 20 est capable de reconnaître des lignées de cancer du sein et de cancer du poumon exprimant DKK1. Ceci constitue une perspective à court terme. Le problème majeur, s'opposant à la réalisation de cette perspective, est que le clone ayant servi à notre étude de polyfonctionnalité ne prolifère plus *in vitro*. Pour palier à ce problème, nous proposons de cloner le TCR de ce clone. Comme rapporté par le Dr. Rosenberg et ses collaborateurs, la technique demande une quantité minime de lymphocytes et est facilement réalisable. Le TCR ainsi généré pourra ensuite être transfecté ou transduit (dépendant du type de vecteur d'expression utilisé) dans les lymphocytes T de patients ou de donneurs normaux (378, 379). Ces lymphocytes génétiquement modifiés pour l'expression du TCR spécifique au peptide 20 de DKK1 pourront ensuite être utilisés dans les essais de lyse impliquant la reconnaissance spécifique des lignées cellulaires de cancer du sein et du poumon, exprimant DKK1. Il serait

également intéressant d'évaluer le portrait de polyfonctionnalité de ces lymphocytes génétiquement modifiés (par analyse des cytokines par multiplexe) et de le comparer avec celui obtenu avec le clone lui-même (Figure 1^{m2} B). L'expression du nouveau TCR pourrait être réalisée dans différents types de T CD8⁺, voir naïfs ou mémoires, afin de comparer le portrait de polyfonctionnalité que confère l'expression de ce TCR et la reconnaissance du peptide 20. L'évaluation de la polyfonctionnalité de chacun des phénotypes pourrait mener à l'identification du profil de cytokines le plus profitable pour l'immunothérapie anti-tumorale par transfert adoptif de lymphocytes génétiquement modifiés.

Afin de rediriger leur spécificité antigénique, l'étape suivant le clonage du TCR et la modification génétique des lymphocytes T est l'évaluation de leur performance dans le cadre d'un transfert adoptif dans le modèle murin. Cette étape fait suite à la validation de spécificité du TCR pour les différentes lignées cellulaires de cancer HLA-A*0201 et positives pour l'expression de DKK1. Le transfert adoptif pourrait être effectué dans une souris comportant une xénogreffe de lignées cellulaires humaines de cancer comme les MDA231 (HLA-A*0201 et DKK1⁺). Ce type de transfert, effectué dans le modèle murin avec xénogreffe, permet d'évaluer l'activité anti-tumorale des lymphocytes redirigés contre la protéine DKK1, ainsi que l'aspect sécurité comme l'évaluation des réactions auto-immunes suite au transfert adoptif. Dans l'éventualité où le TCR que nous avons cloné ne possède pas suffisamment d'affinité pour le peptide 20 et échoue dans la production d'une régression tumorale; il a été démontré qu'il était possible de générer chez la souris, des TCR de forte affinité dirigés spécifiquement contre des TAA humains (240). Ce type de manipulation requiert l'utilisation d'une souris transgénique exprimant le HLA-A*0201, puisque le peptide 20 de DKK1 est présenté par ce type de CMH-I (380). L'immunisation de la souris avec le peptide 20 pourrait amener à l'expansion de T CD8⁺ murins reconnaissant spécifiquement ce peptide. Suite au prélèvement des lymphocytes contenus dans les rates de souris, les T CD8⁺ dirigés contre le peptide 20 peuvent être mis en évidence par essai de reconnaissance *in vitro*. Le clonage du TCR peut ensuite être réalisé

et être transduit dans les lymphocytes pour évaluer sa performance en comparaison avec le TCR déjà disponible (240, 379).

Pour conclure, selon la liste de TAA établie par les Dr. van der Bruggen et Dr. van den Eynde, DKK1 serait un TAA pour le myélome multiple, s'inscrivant dans les 6 caractéristiques requises pour être considéré comme tel (Tableau I) (112). Ceci constitue une excellente base pour considérer la candidature de DKK1 comme TAA des cancers communs. L'exploration de l'utilisation d'un TCR spécifique au peptide 20 dans le transfert adoptif de lymphocytes chez le modèle murin ou encore la vaccination, avec ce même peptide, combinée ou non à une vaccination tel le transfert de gènes, pourrait fournir des résultats pré-cliniques pertinents quant à l'efficacité d'une immunothérapie ciblant DKK1. Les résultats obtenus chez la souris pourraient représenter un bon indicatif pour ensuite transposer ce type de traitement impliquant DKK1 chez l'humain.

5.3 Étude des effets phénotypiques et fonctionnels de la modulation de la voie de Wnt dans les lymphocytes T CD8⁺

5.3.1 Objectifs poursuivis, sommaire et critique des résultats

Notre laboratoire possède une expertise certaine dans la culture primaire des lymphocytes T humains. Cette expertise a été exploitée dans le premier objectif de ce projet de doctorat, lors de l'exploration de l'immunogénicité de DKK1. Elle constitue également une des bases de l'étude phénotypique présentée à la SECTION 4. L'autre point à la base de ce projet est la voie canonique de Wnt qui a aussi été abordée dans le premier objectif puisque la protéine DKK1, proposée comme TAA dans cet objectif, est un inhibiteur de cette voie. Ainsi, dans l'optique d'améliorer la réponse anti-tumorale et la persistance des T CD8⁺ lors d'une immunothérapie par transfert adoptif, nous avons élaboré cette étude.

Impact de l'activation de la voie de Wnt sur le phénotype des TCD8⁺

L'élaboration de cette étude fait suite à une publication du groupe du Dr. NP. Restifo, démontrant que l'activation de la voie de Wnt chez les T CD8⁺ murins permettait la génération de cellules partageant à la fois les caractéristiques de cellules naïves, cellules mémoires (centraux) et cellules souches (T_{SCM}) (304). Ces cellules ainsi générées suite à un traitement avec un inhibiteur de la GSK-3 β (le TWS119), étaient capables d'une réponse anti-tumorale améliorée et d'une plus longue capacité de persistance après transfert adoptif. Bien que le TWS119 soit capable d'activer la voie de Wnt chez les cellules humaines au même titre que chez les cellules murines, aucune étude comme celle rapportée par *Gattinoni et al.* n'avait été exécutée chez les T CD8⁺ humains (304, 381). Nous avons donc élaboré une stratégie de culture de T CD8⁺ du sang circulant de donneurs normaux en présence de TWS119 et de molécules pouvant activer les lymphocytes (IL-2 et anti-CD3) (Figure 13). Cette stratégie comportait également

l'investigation du phénotype des T CD8⁺, par cytométrie en flux, suite à un traitement au TWS119, afin de valider la génération de T_{SCM} chez l'humain. Pour ce faire, nous avons sélectionné des marqueurs présents chez les T CD8⁺ naïfs (CD45RA et CD62L (L-sélectine)), les T_{CM} (CD127 (récepteur de l'IL-7) et CD62L) et les cellules souches (CD133) humaines (Figure 13). Les analyses par cytométrie en flux ont révélé qu'un traitement au TWS119 confère à une grande majorité (72%) de T CD8⁺ activés un caractère naïf, appréciable par une expression élevée des marqueurs CD45RA et CD62L (Figure 14A et B, population A) ainsi qu'un caractère se rapprochant des T_{CM}, visible par une forte augmentation de l'expression du CD127 et des cellules souches, aussi visible par une forte augmentation de l'expression du CD133 (Figure 14C et D). Finalement, nous avons démontré pour la première fois chez l'humain que, suite à un traitement au TWS119, nous observons la formation de T_{SCM} parmi la population de T CD8⁺ (Figure 15D, population A) malgré une certaine variabilité attendue entre les donneurs.

Toujours dans l'optique d'améliorer l'immunothérapie des cancers communs à médiation cellulaire, nous avons exploré la possibilité de générer ce type de cellules (T_{SCM}) chez les T CD8⁺ provenant des TIL de cancer du poumon. Suite à la culture des T CD8⁺ de TIL avec le TWS119 (IL-2 et anti-CD3), nous rapportons l'émergence d'une population dont l'expression du CD45RA est intermédiaire et celle du CD62L est élevée (Figure 16A). Comme observé chez les T CD8⁺ du sang circulant de donneurs normaux, l'activation de la voie de Wnt provoque une augmentation de l'expression du CD127 et du CD133 (Figure 16B et C) chez les T CD8⁺ de TIL. La population de T_{SCM} observée chez les T CD8⁺ du sang circulant exprimant le CD45RA et le CD62L ainsi qu'une positivité pour CD127 et CD133, n'est pas retrouvée comme tel chez les T CD8⁺ de TIL cultivés en présence du TWS119. Par contre, une population similaire, ayant une expression intermédiaire du CD45RA et élevée du CD62L, est observée (Figure 17, en haut, à droite).

Impact de l'activation de la voie de Wnt sur la fonction des TCD8⁺

Finalement, nous avons évalué l'impact de l'activation de la voie de Wnt sur la fonction des T CD8⁺ du sang circulant. Ainsi, après avoir cultivé les T CD8⁺ de 2 donneurs normaux en présence de TWS119 (IL-2 et anti-CD3), nous avons évalué la production d'IFN- γ , suite à une stimulation avec un anticorps anti-CD3 et un anticorps anti-CD28. Ce type de stimulation se voulait plus représentatif d'une stimulation du TCR par l'interaction peptide-CMH-I, plutôt qu'une stimulation PMA-ionomycine ou avec la lectine PHA. L'analyse de l'IFN- γ par cytométrie en flux a révélé peu de différences dans nombre de T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ (avec ou sans TWS119) (Figure 18A). Il est à noter que les conclusions tirées à la suite de ce type d'évaluation auraient probablement profitées d'un plus grand nombre de donneurs. Par contre, les T CD8⁺ du donneur normal #1 affichait tout de même un contenu d'IFN- γ cytoplasmique plus important lorsque traité avec le TWS119 (Figure 18B). Il aurait été intéressant de vérifier l'impact d'un traitement au TWS119 sur la production globale de T CD8⁺, par l'évaluation, par méthode d'ELISA, de la quantité d'IFN- γ , suivant une stimulation avec un anti-CD3 et un anti-CD28. Pour ce qui est de l'impact de l'activation de la voie de Wnt sur la réponse antigénique des T CD8⁺, la culture de clones T CD8⁺ spécifiques à des peptides provenant des protéines virales M1 et NP du virus de l'influenza, en présence de TWS119, a menée à des résultats mitigés. Après un traitement au TWS119, 100% des clones spécifiques au peptide de la protéine M1 contenaient de l'IFN- γ dans leur cytoplasme (en plus grande quantité que les clones non traités) et étaient positifs pour le marqueur de dégranulation CD107a (Figure 18C et D). Ces observations n'ont cependant pas été reconduites avec le clone de T CD8⁺ spécifique au peptide de la protéine NP (Figure 18C et D).

Les résultats obtenus dans l'évaluation de l'impact de l'activation de la voie de Wnt sur la fonction des T CD8⁺ demandent un approfondissement supplémentaire avant de pouvoir tirer des conclusions définitives. Pour l'instant, nous n'avons pu reconduire les résultats obtenus par *Gattinoni et al.*, démontrant qu'un traitement des T CD8⁺ de souris avec le TWS119 engendrait une plus grande quantité d'IFN- γ sécrété. Le modèle de cette

étude est cependant basé sur l'utilisation de T CD8⁺ murins possédant un TCR redirigé contre le TAA gp100. Il s'agit donc d'un modèle où la réponse des T CD8⁺ est stimulée par un antigène défini, par opposition aux cultures que nous avons exécutées avec des T CD8⁺ humains dont la spécificité antigénique est inconnue et dont la quantité obtenue est très souvent limitée. Il faut cependant souligner le phénotype à caractère moins différencié obtenu par l'activation de la voie de Wnt chez les T CD8⁺ humains, provenant du sang circulant ou ayant infiltré les tumeurs de poumon, nous permettant d'envisager également un impact sur la fonction de ces cellules. Il nous faut seulement pousser l'investigation plus loin.

5.3.2 Perspectives et conclusions

Le TWS119 active-t-il la voie canonique de Wnt dans les T CD8⁺ humains?

L'action qu'exerce le TWS119 sur l'activation de la voie canonique de Wnt a été démontrée à maintes reprises chez la souris (303, 304). La liaison du TWS119 à la GSK-3 β module l'activité du complexe formé de cette dernière, avec l'Axin et l'APC, qui normalement maintient la β -catenin phosphorylée, menant ainsi à sa dégradation. *Gattinoni et al.* ont démontré que l'action du TWS119 augmente la β -catenin de façon comparable à celle obtenue avec l'ajout de la molécule Wnt-3a dans les cultures de T CD8⁺ (304). Au cours de cette étude, nous avons démontré une action évidente du TWS119 sur les T CD8⁺, conférant une apparence plus "jeune", semblable à celle rapportée chez les T CD8⁺ de souris. Nous n'avons cependant pas évalué que cette action était bien imputable à l'activation de la voie canonique de Wnt par l'action du TWS119. Ceci constitue une perspective à court terme. La preuve de l'activation de la voie canonique de Wnt pourra être faite par immunobuvardage de type Western, pour la mise en évidence de la présence de la protéine β -catenin dans les T CD8⁺ humains traités avec le TWS119, en comparaison avec les T CD8⁺ non traités. La preuve pourrait également se faire par un essai à la

luciférase (pTOPFLASH), rapportant l'activité des facteurs TCF/LEF, par la liaison de la B-catenin libre ayant traversé au noyau et témoignant ainsi d'une voie de Wnt active (382).

La GSK-3 β est également connue pour être impliquée dans la voie de mTOR (*mammalian target of rapamycin*). La GSK-3 β est un inhibiteur de cette voie de prolifération (383). De part sa liaison avec la GSK-3 β , le TWS119 pourrait ainsi agir sur la voie de mTOR. Cette hypothèse pourrait mériter d'être vérifiée, mais reste peut probable, car l'activation de mTOR engendre une prolifération cellulaire non observée chez les T CD8⁺ activés et traités avec le TWS119. Il semblerait d'ailleurs que l'activation de la voie de Wnt devienne dominant dans un contexte où la voie de mTOR était à la base en contrôle (384). Ainsi, le TWS119 agirait seulement sur le regroupement de GSK-3 β affectant la voie de Wnt. Afin de s'assurer de l'absence d'activation de la voie de mTOR, un traitement au TWS119 pourrait être combiné à un traitement à la Rapamicyne, connue comme inhibiteur de mTOR et qui, à faible dose, pourrait favoriser la génération de T CD8⁺ mémoires (385, 386). Évidemment, la combinaison du TWS119 et de la Rapamicyne commande une nouvelle étude phénotypique et fonctionnelle des T CD8⁺ humains traités avec les 2 agents, seul ou en combinaison.

Perspectives pour l'étude phénotype

Les différents marqueurs de surface que nous avons sélectionnés dans notre étude ont fait l'objet d'un choix judicieux, basé sur la littérature, mais également avec la prise en compte du nombre restreint de paramètres pouvant être évalués simultanément par cytométrie en flux. La cytométrie en flux est une technologie indispensable à ce type d'étude, mais requiert de faire certains choix quant aux marqueurs à évaluer. Ainsi, pour étoffer davantage le côté phénotypique de notre étude, il serait intéressant d'ajouter certaines molécules dans l'investigation. C'est le cas de Bcl-2, une molécule anti-apoptotique associée à la survie des cellules et dont l'expression suit celle du CD127 chez

les cellules mémoires (322). Une forte expression de l'*inhibitory killer cell lectin-like G1* (KLRG-1) a été retrouvée chez les T CD8⁺ effecteurs, affichant un stade terminal de différenciation et une courte vie (387). L'absence ou la faible expression du KLRG-1, chez les T CD8⁺ humains traités avec le TWS119, représenterait l'ajout d'un paramètre différenciant de ceux évalués précédemment dans notre étude. De plus, l'expression du KLRG-1 a été rapportée comme inversement proportionnelle à celle de CD127 et CD62L (387). L'investigation de l'expression des molécules de co-stimulation CD27 et CD28 pourrait également représenter une donnée intéressante à ajouter à cette étude. L'expression de ces 2 marqueurs varie selon le type de T CD8⁺ mémoires et son stade de différenciation; comme par exemple les T_{CM} et les T_{EM} peu différenciés seront CD27⁺ et CD28⁺, alors que chez les T_{EM} plus avancés dans leur différenciation, l'expression du CD27 sera perdue et celle du CD28 sera variable (388).

Perspectives pour l'étude fonctionnelle

Comme il a été mentionné plus tôt, l'étude de la polyfonctionnalité est importante, car elle permet de bien apprécier les différentes fonctions attribuables aux T CD8⁺. L'évaluation d'un nombre restreint de cytokines produites et sécrétées par les cellules peut mener à des conclusions incomplètes ou même de fausses présomptions. Ainsi, il serait important d'utiliser des technologies comme l'analyse de cytokines par multiplexe, afin d'établir un profil de sécrétion plus complet des T CD8⁺ du sang circulant traités avec les TWS119, et de comparer ce profil avec celui des T CD8⁺ simplement activés. Afin de pouvoir encore mieux caractériser le profil fonctionnel des différentes populations de T CD8⁺, obtenues suite à un traitement au TWS119, l'analyse de cytokines par multiplexe pourrait être précédée d'un triage cellulaire par cytométrie en flux. Ainsi, suite à une stimulation par anticorps (anti-CD3 et anti-CD28) ou par une réaction leucocytaire mixte (MLR), il nous serait possible d'établir quel éventail de cytokines est sécrété par les T CD8⁺ présentant un phénotype de T_{SCM} du sang périphérique ou provenant de TIL.

Il sera également possible d'envisager le traitement au TWS119 de T CD8⁺ transduits avec un TCR dirigé contre un antigène et même un TAA donné. Comme mentionné plus tôt, le TWS119 empêche les cellules naïves de proliférer et produit le même effet lorsqu'il est ajouté au moment de l'activation des T CD8⁺. Cette absence de prolifération est également observée, chez les T CD8⁺ murins, lorsque l'expression du facteur TCF est forcée (318). Gattinoni et al. ont également rapporté cette inhibition de prolifération suite au traitement de TWS119 avec des doses plus élevées, comme celles utilisées pour notre étude (entre 5 et 7uM) (304). La génération de T CD8⁺ spécifiques à un antigène par la transduction de TCR, pourrait permettre l'accès rapide à une source importante de lymphocytes dirigés contre des antigènes. Ces T CD8⁺ dont la spécificité a été redirigée, pourrait être utilisés afin d'évaluer l'impacte d'un traitement au TWS119 sur leur fonction cytotoxique, lorsque mis en présence de cellules cibles exprimant l'antigène. Ainsi, avec l'utilisation de TCR dirigés contre des TAA, nous pourrions vérifier l'efficacité de la réponse anti-tumorale des T CD8⁺ (transduits et traités au TWS119) contre des lignées cellulaires de cancer exprimant les TAA sans avoir à considérer le facteur prolifération. Cette stratégie nous conduit à une question des plus intéressants, représentée schématiquement à la Figure 22 et qui est la suivante : l'activation de la voie de Wnt chez un T CD8⁺ transduit avec un TCR spécifique au peptide 20 de DKK1, sera-t-elle inhibée par le DKK1 sécrété par la cellule tumorale? La réponse à cette question devrait être d'une part abordée *in vitro*, par un essai de reconnaissance ou encore un essai de lyse impliquant une lignée cellulaire sécrétant du DKK1 (comme les MDA231), co-cultivée avec des T CD8⁺ transduits avec le TCR spécifique au peptide 20 de DKK1 (identifié dans notre labo) traité ou non avec le TWS119. Selon les résultats obtenus, l'expérience pourrait ensuite être transposée dans un modèle murin de cancer du sein ou de poumon comportant un transfert adoptif de lymphocytes T transduits.

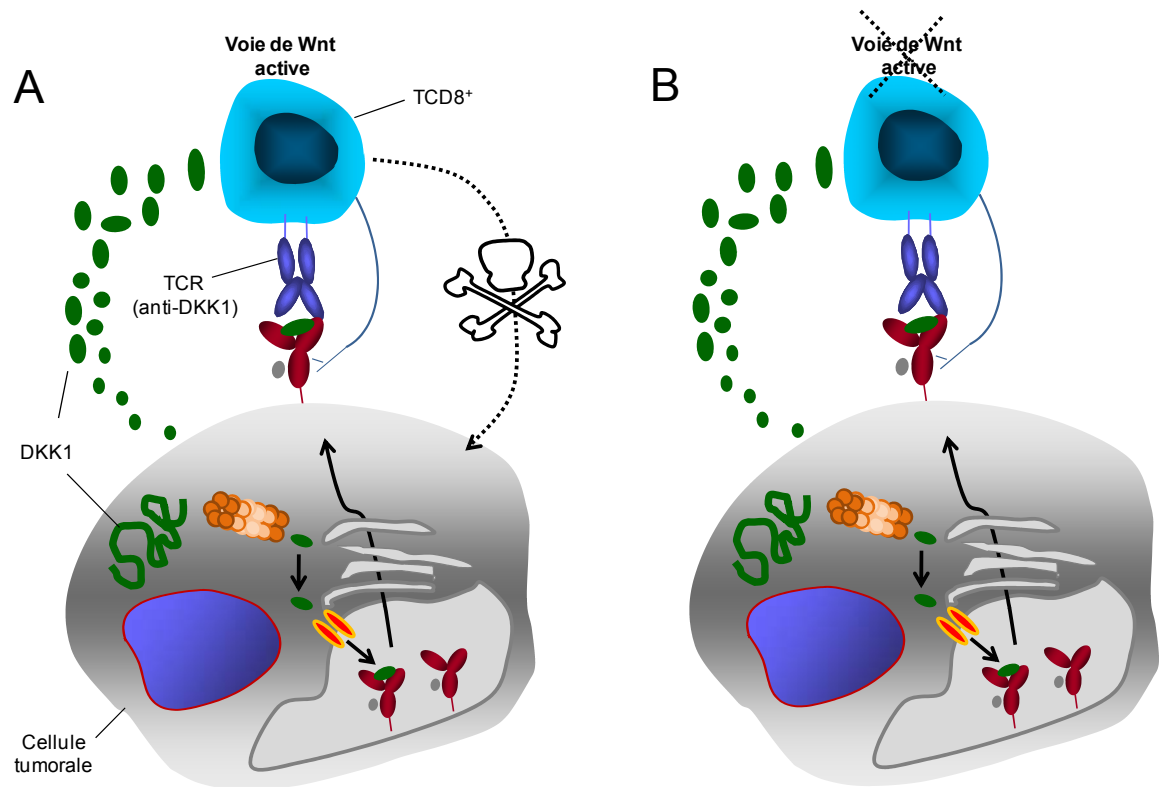


Figure 22. Modèle de compétition entre DKK1 et le TWS119

Légende : A) L'activation de la voie de Wnt par l'action du TWS119 l'emporte sur l'action du DKK1 tumoral. Nonobstant la sécrétion de DKK1 par la cellule tumorale, le T CD8⁺ transduit avec un TCR reconnaissant spécifiquement un peptide de la protéine DKK1 et dont la voie de Wnt a été activée suite à un traitement au TWS119 engendre la mort de la cellule tumorale. B) DKK1 sécrété par la cellule tumorale inhibe l'activation de la voie de Wnt. L'activation de la voie de Wnt est inhibée par l'action de la protéine DKK1 sécrétée par la cellule tumorale, validant l'activité fonctionnelle du DKK1 "tumoral". Dans cette alternative, la réponse anti-tumorale du lymphocyte reste à déterminer.

Pour conclure, comme il a été mentionné au point 1.6.2 de la SECTION 1, l'implication possible de la voie canonique de Wnt dans la génération des T CD8⁺ mémoires centraux n'a été démontré que chez la souris (314, 315). Une de ces études a démontré que l'expression du TCF, combinée avec la stabilisation de la β -catenin, conférait une meilleure réponse antigénique, suite à une seconde infection. Les T CD8⁺ ainsi activés sécrétaient aussi de l'IL-2, laissant ainsi présager une réponse de cellules mémoires (315). Aucune étude n'a jusqu'à maintenant démontré de résultats similaires chez l'humain. Notre étude phénotypique de l'impact de l'activation de la voie de Wnt chez les T CD8⁺ humains (du sang périphérique et des TIL), combinée à l'analyse du profil de sécrétion de cytokines (par multiplexe) de chaque population générée par l'action du TWS119, spécialement la population à caractère de T_{SCM}, pourrait apporter de nombreuses réponses concernant l'utilisation possible de ces cellules en immunothérapie du cancer. Les expériences proposées avec les T CD8⁺, dont la reconnaissance a été redirigée contre un TAA, pourraient également mener à des conclusions intéressantes pour l'immunothérapie tumorale par transfert adoptif.

5.4 Conclusions générales

En conclusion, cette thèse avait comme objectif général de développer différentes stratégies afin d'améliorer l'immunothérapie anti-tumorale à médiation cellulaire, principalement pour les cancers communs. Le premier objectif était la caractérisation de DKK1 comme TAA pour les cancers communs. Les résultats obtenus dans cet objectif témoignent de l'expression de DKK1 dans les tumeurs de cancer du sein, plus spécifiquement les tumeurs comportant un mauvais pronostic. Nous rapportons également une expression de DKK1 chez 50% des tumeurs de cancer du poumon, ainsi que chez 30% des tumeurs provenant de cancer du rein. Dans la poursuite de cet objectif, nous avons évalué l'immunogénicité de DKK1 et fait l'identification d'un peptide pouvant être reconnu par les T CD8⁺ de patients atteints d'un cancer du poumon ou du sein. Nous avons ensuite procédé à une étude de polyfonctionnalité d'un clone de T CD8⁺ spécifique à DKK1, isolé d'un patient de cancer du poumon. Cette étude a révélé un profil effecteur de type Th1 profitable dans l'optique d'une réponse anti-tumorale. Ces travaux de recherche représentent l'accomplissement d'une étape très importante dans la validation de la candidature de DKK1 comme TAA pour les cancers communs.

Le deuxième objectif portait sur l'étude phénotypique et fonctionnelle de l'impact de la modulation de la voie de Wnt dans les T CD8⁺. Dans cet objectif, nous rapportons l'observation d'un phénotype jamais rapporté chez l'humain, conférant au T CD8⁺ un aspect moins différencié, partagé avec un aspect de cellule mémoire, qui pourrait s'avérer être important pour l'immunothérapie du cancer.

Ces travaux auront donc atteints un double but, soit de contribuer à la fois en recherche fondamentale et appliquée; ceci en offrant de nouvelles options stratégiques pouvant être exploitées dans une immunothérapie anti-tumorale à médiation cellulaire pour les cancers communs. De plus, nous avons mis à jour un phénotype nouveau chez les lymphocytes T humains, témoignant encore une fois de la plasticité de ces cellules.

Bibliographie

1. Comité directeur de la Société canadienne du cancer. Statistiques canadiennes sur le cancer 2010. Toronto: Société canadienne du cancer; 2010.
2. National Cancer Institute (NCI). Common Cancer Types. U.S. National Institutes of Health; [updated 4 novembre 2010; cited 2010 10 novembre]; Available from: www.cancer.gov/cancertopics/types/commoncancers.
3. Spiro SG, Silvestri GA. One hundred years of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Sep 1;172(5):523-9.
4. Inamura K, Ishikawa Y. Lung cancer progression and metastasis from the prognostic point of view. *Clin Exp Metastasis*. 2010 Aug;27(6):389-97.
5. Jones KD. An update on lung cancer staging. *Adv Anat Pathol*. 2010 Jan;17(1):33-7.
6. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):718-30.
7. Sainsbury JR, Anderson TJ, Morgan DA. ABC of breast diseases: breast cancer. *BMJ*. 2000 Sep 23;321(7263):745-50.
8. Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, et al. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):209-29.
9. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
10. fedi P TS, Aaronson SA. Growth factors. Dans *Cancer Medecine*. Holland JF BR, Morton DL, Frei E, Kute DW, editor. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997.
11. Hunter T. Oncoprotein networks. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):333-46.
12. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995 May 5;81(3):323-30.
13. Fynan TM, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Crit Rev Oncog*. 1993;4(5):493-540.
14. Harris CC. p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*. 1996 Jun;17(6):1187-98.

15. Hayflick L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)*. 1997 Nov;62(11):1180-90.
16. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
17. Sporn MB. The war on cancer. *Lancet*. 1996 May 18;347(9012):1377-81.
18. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009 Jul;30(7):1073-81.
19. Osborne BK, J. Goldsby, RA. Kindt, TJ. Kuby Immunology. 6 ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2007.
20. Mantovani A. Cancer: Inflaming metastasis. *Nature*. 2009 Jan 1;457(7225):36-7.
21. Marchesi F, Piemonti L, Fedele G, Destro A, Roncalli M, Albarello L, et al. The chemokine receptor CX3CR1 is involved in the neural tropism and malignant behavior of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):9060-9.
22. Amersi FF, Terando AM, Goto Y, Scolyer RA, Thompson JF, Tran AN, et al. Activation of CCR9/CCL25 in cutaneous melanoma mediates preferential metastasis to the small intestine. *Clin Cancer Res*. 2008 Feb 1;14(3):638-45.
23. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*. 1957 Apr 6;1(5022):779-86.
24. Rygaard J, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*. 1974 Feb;82(1):99-106.
25. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8.
26. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer*. 1995 Jan 17;60(2):183-9.
27. Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, et al. Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg*. 1995 Dec;60(6):1623-6.
28. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010 Feb 25;29(8):1093-102.

29. Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer*. 1996 Apr 1;77(7):1303-10.
30. Badoual C, Hans S, Fridman WH, Brasnu D, Erdman S, Tartour E. Revisiting the prognostic value of regulatory T cells in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Jul 1;27(19):e5-6; author reply e7.
31. Cho Y, Miyamoto M, Kato K, Fukunaga A, Shichinohe T, Kawarada Y, et al. CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 2003 Apr 1;63(7):1555-9.
32. Karja V, Aaltomaa S, Lipponen P, Isotalo T, Talja M, Mokka R. Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. *Anticancer Res*. 2005 Nov-Dec;25(6C):4435-8.
33. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2008 Sep 15;113(6):1387-95.
34. Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):5132-6.
35. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Dec 10;27(35):5944-51.
36. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20;102(51):18538-43.
37. Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjjatic S, et al. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 6;104(10):3967-72.
38. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
39. Douglas A, Arenberg SLK, Peter J, Polverini, Susan B, Morris, Marie D, Burdick, Mary C, Glass, Dennis T, Taub, Mark D, Iannettoni, Richard I, Whyte, and Robert M. Strieter. Interferon-g-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits

- human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. *J Exp Med*. 1996 september;184:981-92.
40. Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):11-22.
 41. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:271-96.
 42. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
 43. Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 1997 Nov 1;90(9):3245-87.
 44. Rammensee HG, Friede T, Stevanović S. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics*. 1995;41(4):178-228.
 45. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998 Mar 5;392(6671):86-9.
 46. Reis e Sousa C, Germain RN. Major histocompatibility complex class I presentation of peptides derived from soluble exogenous antigen by a subset of cells engaged in phagocytosis. *J Exp Med*. 1995 Sep 1;182(3):841-51.
 47. Rock KL. A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today*. 1996 Mar;17(3):131-7.
 48. Hoffmann TK, Meidenbauer N, Dworacki G, Kanaya H, Whiteside TL. Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res*. 2000 Jul 1;60(13):3542-9.
 49. Russo V, Tanzarella S, Dalerba P, Rigatti D, Rovere P, Villa A, et al. Dendritic cells acquire the MAGE-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 29;97(5):2185-90.
 50. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.
 51. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255-8.
 52. Bryant PW, Lennon-Dumenil AM, Fiebiger E, Lagaudriere-Gesbert C, Ploegh HL. Proteolysis and antigen presentation by MHC class II molecules. *Adv Immunol*. 2002;80:71-114.

53. Strawbridge AB, Blum JS. Autophagy in MHC class II antigen processing. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):87-92.
54. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 1994 Sep 9;78(5):761-71.
55. Yewdell JW, Nicchitta CV. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol*. 2006 Aug;27(8):368-73.
56. Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature*. 2000 Apr 13;404(6779):774-8.
57. Klotzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Mar;2(3):179-87.
58. Burgdorf S, Kurts C. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol*. 2008 Feb;20(1):89-95.
59. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007 Dec 6;450(7171):903-7.
60. Gerlinger M, Swanton C. How Darwinian models inform therapeutic failure initiated by clonal heterogeneity in cancer medicine. *Br J Cancer*. 2010 Oct 12;103(8):1139-43.
61. Longhi MP, Wright K, Lauder SN, Nowell Ma, Jones GW, Godkin AJ, et al. Interleukin-6 is crucial for recall of influenza-specific memory CD4 T cells. *PLoS Pathog*. 2008;4:e1000006.
62. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*. 1997 Feb;18(2):89-95.
63. Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, et al. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens*. 1996 May;47(5):364-71.
64. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tatake R, Zeff RA, Ferrone S. Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest*. 1991 Jan;87(1):284-92.
65. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol*. 2002 Feb;12(1):3-13.

66. Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, et al. Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2005 Apr 1;11(7):2552-60.
67. Atkins D, Ferrone S, Schmahl GE, Storkel S, Seliger B. Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma? *J Urol*. 2004 Feb;171(2 Pt 1):885-9.
68. Seliger B, Stoehr R, Handke D, Mueller A, Ferrone S, Wullich B, et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Apr;59(4):529-40.
69. Garrido F, Algarra I, Garcia-Lora AM. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol Immunother*. 2010 Oct;59(10):1601-6.
70. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nat Med*. 2001 Oct;7(10):1118-22.
71. Kawamura K, Bahar R, Natsume W, Sakiyama S, Tagawa M. Secretion of interleukin-10 from murine colon carcinoma cells suppresses systemic antitumor immunity and impairs protective immunity induced against the tumors. *Cancer Gene Ther*. 2002 Jan;9(1):109-15.
72. Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 2007 May;117(5):1147-54.
73. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci*. 2010 Nov 10.
74. Kojima A, Prehn RT. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics*. 1981;14(1-2):15-27.
75. Asano M, Toda M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med*. 1996 Aug 1;184(2):387-96.
76. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
77. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

78. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003 Apr;4(4):330-6.
79. Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. Tumor evasion of the immune system by converting CD4⁺CD25⁻ T cells into CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*. 2007 Mar 1;178(5):2883-92.
80. Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y. Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol*. 2008 Apr 15;180(8):5163-6.
81. Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, et al. FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1275-86.
82. Paust S, Lu L, McCarty N, Cantor H. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jul 13;101(28):10398-403.
83. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*. 2006 Jun;118(2):240-9.
84. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007 Nov 22;450(7169):566-9.
85. Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, et al. A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997 Oct 16;389(6652):737-42.
86. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*. 1994 Aug 26;265(5176):1237-40.
87. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nat Immunol*. 2007 Dec;8(12):1353-62.
88. Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005 Feb 15;174(4):1783-6.

89. Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*. 2007 Oct;27(4):635-46.
90. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*. 1999 Nov 15;163(10):5211-8.
91. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3128-33.
92. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, et al. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med*. 2005 May 16;201(10):1591-602.
93. (NCI) NCI. Cyclophosphamide. U.S. National Institutes of Health; [cited 2010 7 décembre]; Available from: <http://www.cancer.gov/Templates/drugdictionary.aspx?CdrID=39748>.
94. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*. 2003 Sep 1;98(5):1089-99.
95. Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 1;24(34):5373-80.
96. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):942-9.
97. Talmadge JE, Donkor M, Scholar E. Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 Dec;26(3-4):373-400.
98. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009 Mar;9(3):162-74.
99. Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*. 2006 Jan 1;176(1):284-90.
100. Bunt SK, Yang L, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res*. 2007 Oct 15;67(20):10019-26.

101. Song X, Krelin Y, Dvorkin T, Bjorkdahl O, Segal S, Dinarello CA, et al. CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol*. 2005 Dec 15;175(12):8200-8.
102. Marx J. Cancer immunology. Cancer's bulwark against immune attack: MDS cells. *Science*. 2008 Jan 11;319(5860):154-6.
103. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*. 2003 Jun;24(6):302-6.
104. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, Kinarsky L, Sherman S, Kang L, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*. 2007 Jul;13(7):828-35.
105. Hanson EM, Clements VK, Sinha P, Ilkovitch D, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 2009 Jul 15;183(2):937-44.
106. Young MR, Newby M, Wepsic HT. Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*. 1987 Jan 1;47(1):100-5.
107. Buessow SC, Paul RD, Lopez DM. Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Jul;73(1):249-55.
108. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1755-66.
109. Ugel S, Delpozzi F, Desantis G, Papalini F, Simonato F, Sonda N, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Aug;9(4):470-81.
110. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643-7.
111. Romero P, Cerottini JC, Speiser DE. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother*. 2004 Mar;53(3):249-55.
112. van der Bruggen PS, V. Vigneron, N. Van de Eynde, B. Peptide Database, T-cell defined tumor antigens. *Cancer Immunity*; 2001 [updated 12 juillet 2010; cited 2010 27 novembre]; Available from: www.cancerimmunity.org/peptidedatabase/Tcellepitopes.htm.

113. Pilla L, Rivoltini L, Patuzzo R, Marrari A, Valdagni R, Parmiani G. Multipeptide vaccination in cancer patients. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Aug;9(8):1043-55.
114. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3):1185-92.
115. Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science*. 1995 Sep 1;269(5228):1281-4.
116. Novellino L, Castelli C, Parmiani G. A listing of human tumor antigens recognized by T cells: March 2004 update. *Cancer Immunol Immunother*. 2005 Mar;54(3):187-207.
117. Caspi RR. Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):970-6.
118. Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, et al. Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med*. 1993 Apr 1;177(4):989-98.
119. van der Schouw YT, Verbeek AL, Wobbes T, Segers MF, Thomas CM. Comparison of four serum tumour markers in the diagnosis of colorectal carcinoma. *Br J Cancer*. 1992 Jul;66(1):148-54.
120. Tan E, Gouvas N, Nicholls RJ, Ziprin P, Xynos E, Tekkis PP. Diagnostic precision of carcinoembryonic antigen in the detection of recurrence of colorectal cancer. *Surg Oncol*. 2009 Mar;18(1):15-24.
121. Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT, Festenstein H. Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol*. 1989 Jul;19(7):1215-20.
122. Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, et al. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med*. 1998 Jan 19;187(2):265-70.
123. Fujita S, Wada H, Jungbluth AA, Sato S, Nakata T, Noguchi Y, et al. NY-ESO-1 expression and immunogenicity in esophageal cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Oct 1;10(19):6551-8.
124. Pilla L, Rivoltini L, Patuzzo R, Marrari A, Valdagni R, Parmiani G. Multipeptide vaccination in cancer patients. *Pancreas*. 2009:1043-55.
125. Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J*. 2003 Dec;79(938):672-80.

126. Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther.* 1994;64(3):529-64.
127. Hudson MA, Herr HW. Carcinoma in situ of the bladder. *J Urol.* 1995 Mar;153(3 Pt 1):564-72.
128. Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, et al. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Aug 3;86(15):1159-66.
129. Rosenberg SA, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, et al. Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin 2. *JAMA.* 1994 Mar 23-30;271(12):907-13.
130. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol.* 2009 Oct;21(10):1105-11.
131. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Med.* 2005 Nov;11(11):1238-43.
132. Helen Chapel MH, Siraj Misbah, Neil Snowden. *Clinical Immunology*, 4th edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 1999.
133. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006 Nov;6(11):836-48.
134. Schadendorf D, Algarra SM, Bastholt L, Cinat G, Dreno B, Eggermont AM, et al. Immunotherapy of distant metastatic disease. *Ann Oncol.* 2009 Aug;20 Suppl 6:vi41-50.
135. Rizza P, Moretti F, Belardelli F. Recent advances on the immunomodulatory effects of IFN-alpha: implications for cancer immunotherapy and autoimmunity. *Autoimmunity.* 2010 Apr;43(3):204-9.
136. Parmiani G, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M. Cytokines in cancer therapy. *Immunol Lett.* 2000 Sep 15;74(1):41-4.
137. Okur FV, Brenner MK. Cellular immunotherapy of cancer. *Methods Mol Biol.* 2010;651:319-45.
138. Ferris RL, Jaffee EM, Ferrone S. Tumor antigen-targeted, monoclonal antibody-based immunotherapy: clinical response, cellular immunity, and immunoescape. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 1;28(28):4390-9.

139. Dhodapkar KM, Krasovsky J, Williamson B, Dhodapkar MV. Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J Exp Med*. 2002 Jan 7;195(1):125-33.
140. Brenner MK, Heslop HE. Adoptive T cell therapy of cancer. *Curr Opin Immunol*. 2010 Apr;22(2):251-7.
141. Chang HR. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer*. 2010 Jun 15;116(12):2856-67.
142. Disis ML, Wallace DR, Gooley TA, Dang Y, Slota M, Lu H, et al. Concurrent trastuzumab and HER2/neu-specific vaccination in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2009 Oct 1;27(28):4685-92.
143. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin*. 2010 Jul-Aug;60(4):222-43.
144. Moon C, Chae YK, Lee J. Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2010 Aug;235(8):907-20.
145. Carver JR. Management of trastuzumab-related cardiac dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010 Sep-Oct;53(2):130-9.
146. Peggs KS, Quezada SA, Allison JP. Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. *Immunol Rev*. 2008 Aug;224:141-65.
147. Sarnaik AA, Weber JS. Recent advances using anti-CTLA-4 for the treatment of melanoma. *Cancer J*. 2009 May-Jun;15(3):169-73.
148. Movva S, Verschraegen C. The monoclonal antibody to cytotoxic T lymphocyte antigen 4, ipilimumab (MDX-010), a novel treatment strategy in cancer management. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 Feb;9(2):231-41.
149. Attia P, Phan GQ, Maker AV, Robinson MR, Quezada MM, Yang JC, et al. Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 1;23(25):6043-53.
150. Sanderson K, Scotland R, Lee P, Liu D, Groshen S, Snively J, et al. Autoimmunity in a phase I trial of a fully human anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 monoclonal antibody with multiple melanoma peptides and Montanide ISA 51 for patients with resected stages III and IV melanoma. *J Clin Oncol*. 2005 Feb 1;23(4):741-50.

151. Yang JC, Hughes M, Kammula U, Royal R, Sherry RM, Topalian SL, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother*. 2007 Nov-Dec;30(8):825-30.
152. Balwit J. FDA Approves Ipilimumab, Major Breakthrough in Cancer Immunotherapy. Milwaukee: Society for Immunotherapy of Cancer (sitc) 2011 25 mars 2011.
153. (NCI) NCI. Montanide ISA-51. U.S. National Institutes of Health; [cited 2010 2 décembre]; Available from: <http://www.cancer.gov/dictionary/?CdrID=45964>.
154. Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):909-15.
155. Alexandrescu DT, Ichim TE, Riordan NH, Marincola FM, Di Nardo A, Kabigting FD, et al. Immunotherapy for melanoma: current status and perspectives. *J Immunother*. 2010 Jul-Aug;33(6):570-90.
156. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):155-7.
157. Butterfield LH, Ribas A, Dissette VB, Amarnani SN, Vu HT, Oseguera D, et al. Determinant spreading associated with clinical response in dendritic cell-based immunotherapy for malignant melanoma. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):998-1008.
158. Yamshchikov GV, Mullins DW, Chang C-c, Ogino T, Thompson L, Presley J, et al. Sequential Immune Escape and Shifting of T Cell Responses in a Long-Term Survivor of Melanoma 1. 2005.
159. Slingluff CL, Jr., Petroni GR, Chianese-Bullock KA, Smolkin ME, Hibbitts S, Murphy C, et al. Immunologic and clinical outcomes of a randomized phase II trial of two multipptide vaccines for melanoma in the adjuvant setting. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 1;13(21):6386-95.
160. Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, et al. Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res*. 2008 Jan 1;14(1):178-87.
161. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med*. 1999 Mar 1;189(5):753-6.
162. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdiv DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2205-13.

163. Chiang CL, Benencia F, Coukos G. Whole tumor antigen vaccines. *Semin Immunol*. 2010 Jun;22(3):132-43.
164. Zhang Y, Ma B, Zhou Y, Zhang M, Qiu X, Sui Y, et al. Dendritic cells fused with allogeneic breast cancer cell line induce tumor antigen-specific CTL responses against autologous breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2007 Nov;105(3):277-86.
165. Brill TH, Kubler HR, Pohla H, Buchner A, Fend F, Schuster T, et al. Therapeutic vaccination with an interleukin-2-interferon-gamma-secreting allogeneic tumor vaccine in patients with progressive castration-resistant prostate cancer: a phase I/II trial. *Hum Gene Ther*. 2009 Dec;20(12):1641-51.
166. Neller MA, Lopez JA, Schmidt CW. Antigens for cancer immunotherapy. *Semin Immunol*. 2008 Oct;20(5):286-95.
167. Mears R, Craven RA, Hanrahan S, Totty N, Upton C, Young SL, et al. Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics*. 2004 Dec;4(12):4019-31.
168. Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):435-42.
169. Wu A, Oh S, Gharagozlou S, VEDI RN, Ericson K, Low WC, et al. In vivo vaccination with tumor cell lysate plus CpG oligodeoxynucleotides eradicates murine glioblastoma. *J Immunother*. 2007 Nov-Dec;30(8):789-97.
170. Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000 May 4;405(6782):85-90.
171. Larsson M, Fonteneau JF, Bhardwaj N. Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol*. 2001 Mar;22(3):141-8.
172. Dranoff G, Jaffee E, Lazenby A, Golumbek P, Levitsky H, Brose K, et al. Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3539-43.
173. Simmons AD, Li B, Gonzalez-Edick M, Lin C, Moskalenko M, Du T, et al. GM-CSF-secreting cancer immunotherapies: preclinical analysis of the mechanism of action. *Cancer Immunol Immunother*. 2007 Oct;56(10):1653-65.
174. Antonarakis ES, Drake CG. Current status of immunological therapies for prostate cancer. *Curr Opin Urol*. 2010 May;20(3):241-6.

175. Ward JE, McNeel DG. GVAX: an allogeneic, whole-cell, GM-CSF-secreting cellular immunotherapy for the treatment of prostate cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 Dec;7(12):1893-902.
176. Cumberbatch M, Kimber I. Tumour necrosis factor-alpha is required for accumulation of dendritic cells in draining lymph nodes and for optimal contact sensitization. *Immunology*. 1995 Jan;84(1):31-5.
177. Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2007 Aug;7(8):610-21.
178. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
179. Nencioni A, Grunebach F, Schmidt SM, Muller MR, Boy D, Patrone F, et al. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008 Mar;65(3):191-9.
180. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Wu L, Engleman EG. Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):4254-9.
181. Bedrosian I, Mick R, Xu S, Nisenbaum H, Faries M, Zhang P, et al. Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol*. 2003 Oct 15;21(20):3826-35.
182. Dendreon. PROVENGE (sipuleucel-T). Dendreon Corporation; 2010 [updated avil 2010; cited 2011 1 mai]; Available from: www.provenge.com.
183. Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, Burch PA, Nemunaitis J, Yuh L, et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer*. 2009 Aug 15;115(16):3670-9.
184. Smits EL, Anguille S, Cools N, Berneman ZN, Van Tendeloo VF. Dendritic cell-based cancer gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2009 Oct;20(10):1106-18.
185. Fioretti D, Iurescia S, Fazio VM, Rinaldi M. DNA vaccines: developing new strategies against cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:174378.
186. Einfeld DA, Schroeder R, Roelvink PW, Lizonova A, King CR, Kovesdi I, et al. Reducing the native tropism of adenovirus vectors requires removal of both CAR and integrin interactions. *J Virol*. 2001 Dec;75(23):11284-91.

187. Denis-Mize KS, Dupuis M, MacKichan ML, Singh M, Doe B, O'Hagan D, et al. Plasmid DNA adsorbed onto cationic microparticles mediates target gene expression and antigen presentation by dendritic cells. *Gene Ther.* 2000 Dec;7(24):2105-12.
188. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990 Mar 23;247(4949 Pt 1):1465-8.
189. Ulmer J, Donnelly J, Parker S, Rhodes G, Felgner P, Dwarki V, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science.* 1993;259(5102):1745-9.
190. Liu MA, Ulmer JB. Human clinical trials of plasmid DNA vaccines. *Adv Genet.* 2005;55:25-40.
191. Wolff J, Lewis DL, Herweijer H, Hegge J, Hagstrom J. Non-viral approaches for gene transfer. *Acta Myol.* 2005 Dec;24(3):202-8.
192. Porgador A, Irvine KR, Iwasaki A, Barber BH, Restifo NP, Germain RN. Predominant role for directly transfected dendritic cells in antigen presentation to CD8+ T cells after gene gun immunization. *J Exp Med.* 1998 Sep 21;188(6):1075-82.
193. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, et al. Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med.* 1997 Jun;3(6):362-71.
194. Chattergoon MA, Robinson TM, Boyer JD, Weiner DB. Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1998 Jun 15;160(12):5707-18.
195. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis.* 1998 Jul;178(1):92-100.
196. Miller AM, Ozenci V, Kiessling R, Pisa P. Immune monitoring in a phase 1 trial of a PSA DNA vaccine in patients with hormone-refractory prostate cancer. *J Immunother.* 2005 Jul-Aug;28(4):389-95.
197. McNeel DG, Dunphy EJ, Davies JG, Frye TP, Johnson LE, Staab MJ, et al. Safety and immunological efficacy of a DNA vaccine encoding prostatic acid phosphatase in patients with stage D0 prostate cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 1;27(25):4047-54.
198. Perales MA, Yuan J, Powel S, Gallardo HF, Rasalan TS, Gonzalez C, et al. Phase I/II study of GM-CSF DNA as an adjuvant for a multi-peptide cancer vaccine in patients with advanced melanoma. *Mol Ther.* 2008 Dec;16(12):2022-9.

199. Trimble CL, Peng S, Kos F, Gravitt P, Viscidi R, Sugar E, et al. A phase I trial of a human papillomavirus DNA vaccine for HPV16+ cervical intraepithelial neoplasia 2/3. *Clin Cancer Res.* 2009 Jan 1;15(1):361-7.
200. Liu MA. Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity.* 2010 Oct 29;33(4):504-15.
201. Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology.* 1996 May 1;219(1):220-7.
202. Dharmapuri S, Peruzzi D, Aurisicchio L. Engineered adenovirus serotypes for overcoming anti-vector immunity. *Expert Opin Biol Ther.* 2009 Oct;9(10):1279-87.
203. Aurisicchio L, Mennuni C, Giannetti P, Calvaruso F, Nuzzo M, Cipriani B, et al. Immunogenicity and safety of a DNA prime/adenovirus boost vaccine against rhesus CEA in nonhuman primates. *Int J Cancer.* 2007 Jun 1;120(11):2290-300.
204. Ryan SO, Gantt KR, Finn OJ. Tumor antigen-based immunotherapy and immunoprevention of cancer. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007;142(3):179-89.
205. Peruzzi D, Dharmapuri S, Cirillo A, Bruni BE, Nicosia A, Cortese R, et al. A novel chimpanzee serotype-based adenoviral vector as delivery tool for cancer vaccines. *Vaccine.* 2009 Feb 25;27(9):1293-300.
206. Harrington LE, Most Rv R, Whitton JL, Ahmed R. Recombinant vaccinia virus-induced T-cell immunity: quantitation of the response to the virus vector and the foreign epitope. *J Virol.* 2002 Apr;76(7):3329-37.
207. Smith CL, Dunbar PR, Mirza F, Palmowski MJ, Shepherd D, Gilbert SC, et al. Recombinant modified vaccinia Ankara primes functionally activated CTL specific for a melanoma tumor antigen epitope in melanoma patients with a high risk of disease recurrence. *Int J Cancer.* 2005 Jan 10;113(2):259-66.
208. Hodge JW, McLaughlin JP, Kantor JA, Schlom J. Diversified prime and boost protocols using recombinant vaccinia virus and recombinant non-replicating avian pox virus to enhance T-cell immunity and antitumor responses. *Vaccine.* 1997 Apr-May;15(6-7):759-68.
209. Harrop R, Connolly N, Redchenko I, Valle J, Saunders M, Ryan MG, et al. Vaccination of colorectal cancer patients with modified vaccinia Ankara delivering the tumor antigen 5T4 (TroVax) induces immune responses which correlate with disease control: a phase I/II trial. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3416-24.

210. Ishizaki H, Song GY, Srivastava T, Carroll KD, Shahabi V, Manuel ER, et al. Heterologous prime/boost immunization with p53-based vaccines combined with toll-like receptor stimulation enhances tumor regression. *J Immunother*. 2010 Jul-Aug;33(6):609-17.
211. AFM AFcIM. MUSCLEPEDIA. Paris: AFM; [cited 2011 8 janvier]; Tome 9 - Approche Thérapeutique -Thérapie génique]. Available from: www.musclepedia.com
212. Breckpot K, Emeagi PU, Thielemans K. Lentiviral vectors for anti-tumor immunotherapy. *Curr Gene Ther*. 2008 Dec;8(6):438-48.
213. Hu B, Yang H, Dai B, Tai A, Wang P. Nonintegrating lentiviral vectors can effectively deliver ovalbumin antigen for induction of antitumor immunity. *Hum Gene Ther*. 2009 Dec;20(12):1652-64.
214. Niedobitek G. Epstein-Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol*. 2000 Oct;53(5):248-54.
215. Straathof KC, Bollard CM, Popat U, Huls MH, Lopez T, Morriss MC, et al. Treatment of nasopharyngeal carcinoma with Epstein-Barr virus--specific T lymphocytes. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):1898-904.
216. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Dec 10;99(25):16168-73.
217. Muranski P, Restifo NP. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4 + T cells. *Curr Opin Immunol*. 2009:200-8.
218. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*. 2008 Jun 19;358(25):2698-703.
219. Mazumder A, Rosenberg SA. Successful immunotherapy of natural killer-resistant established pulmonary melanoma metastases by the intravenous adoptive transfer of syngeneic lymphocytes activated in vitro by interleukin 2. *J Exp Med*. 1984 Feb 1;159(2):495-507.
220. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med*. 1988 Dec 22;319(25):1676-80.
221. Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity*. 1999 Mar;10(3):281-7.

222. Rosenberg SA, Restifo NP, Yang JC, Morgan RA, Dudley ME. Adoptive cell transfer : a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature*. 2008;2.
223. Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*. 2002 Oct 25;298(5594):850-4.
224. Dudley ME, Wunderlich JR, Yang JC, Sherry RM, Topalian SL, Restifo NP, et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2346-57.
225. Paulos CM, Kaiser A, Wrzesinski C, Hinrichs CS, Cassard L, Boni A, et al. Toll-like receptors in tumor immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007 Sep 15;13(18 Pt 1):5280-9.
226. Paulos CM, Wrzesinski C, Kaiser A, Hinrichs CS, Chieppa M, Cassard L, et al. Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest*. 2007 Aug;117(8):2197-204.
227. Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, et al. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol*. 2008 Nov 10;26(32):5233-9.
228. Goff SL, Smith FO, Klapper JA, Sherry R, Wunderlich JR, Steinberg SM, et al. Tumor infiltrating lymphocyte therapy for metastatic melanoma: analysis of tumors resected for TIL. *J Immunother*. 2010 Oct;33(8):840-7.
229. Dudley ME, Gross CA, Langan MM, Garcia MR, Sherry RM, Yang JC, et al. CD8+ enriched "young" tumor infiltrating lymphocytes can mediate regression of metastatic melanoma. *Clin Cancer Res*. 2010 Jul 28.
230. Prieto PA, Durflinger KH, Wunderlich JR, Rosenberg SA, Dudley ME. Enrichment of CD8+ cells from melanoma tumor-infiltrating lymphocyte cultures reveals tumor reactivity for use in adoptive cell therapy. *J Immunother*. 2010 Jun;33(5):547-56.
231. Zhou J, Dudley ME, Rosenberg SA, Robbins PF. Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy. *J Immunother*. 2005 Jan-Feb;28(1):53-62.
232. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32.
233. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol*. 2007 Sep;8(9):950-7.

234. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4⁺ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. *Nat Immunol*. 2007 Apr;8(4):369-77.
235. Numasaki M, Fukushi J, Ono M, Narula SK, Zavodny PJ, Kudo T, et al. Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003 Apr 1;101(7):2620-7.
236. Muranski P, Boni A, Antony PA, Cassard L, Irvine KR, Kaiser A, et al. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):362-73.
237. Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP, et al. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*. 2008 Jul 18;29(1):44-56.
238. Cohen CJ, Zhao Y, Zheng Z, Rosenberg SA, Morgan RA. Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res*. 2006 Sep 1;66(17):8878-86.
239. Morgan RA, Dudley ME, Wunderlich JR, Hughes MS, Yang JC, Sherry RM, et al. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science*. 2006 Oct 6;314(5796):126-9.
240. Johnson LA, Morgan RA, Dudley ME, Cassard L, Yang JC, Hughes MS, et al. Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Gene Ther*. 2009;114:535-46.
241. Davis JL, Theoret MR, Zheng Z, Lamers CH, Rosenberg SA, Morgan RA. Development of Human Anti-Murine T-Cell Receptor Antibodies in Both Responding and Nonresponding Patients Enrolled in TCR Gene Therapy Trials. *Clin Cancer Res*. 2010 Dec 1;16(23):5852-61.
242. Bendle GM, Linnemann C, Hooijkaas AI, Bies L, de Witte MA, Jorritsma A, et al. Lethal graft-versus-host disease in mouse models of T cell receptor gene therapy. *Nat Med*. 2010 May;16(5):565-70, 1p following 70.
243. Brenner M. T cell receptors and cancer : gain gives pain. Nature Publishing Group. 2010;16:520-1.
244. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):10024-8.

245. Lamers CH, Sleijfer S, Vulto AG, Kruit WH, Kliffen M, Debets R, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol*. 2006 May 1;24(13):e20-2.
246. Finney HM, Akbar AN, Lawson AD. Activation of resting human primary T cells with chimeric receptors: costimulation from CD28, inducible costimulator, CD134, and CD137 in series with signals from the TCR zeta chain. *J Immunol*. 2004 Jan 1;172(1):104-13.
247. Emtage PC, Lo AS, Gomes EM, Liu DL, Gonzalo-Daganzo RM, Junghans RP. Second-generation anti-carcinoembryonic antigen designer T cells resist activation-induced cell death, proliferate on tumor contact, secrete cytokines, and exhibit superior antitumor activity in vivo: a preclinical evaluation. *Clin Cancer Res*. 2008 Dec 15;14(24):8112-22.
248. Stagg J, Johnstone RW, Smyth MJ. From cancer immunosurveillance to cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2007 Dec;220:82-101.
249. Cheever MA. Twelve immunotherapy drugs that could cure cancers. *Immunol Rev*. 2008 Apr;222:357-68.
250. Gattinoni L, Klebanoff CA, Restifo NP. Pharmacologic induction of CD8+ T cell memory: better living through chemistry. *Sci Transl Med*. 2009 Dec 16;1(11):11ps2.
251. Sibille C, Chomez P, Wildmann C, Van Pel A, De Plaen E, Maryanski JL, et al. Structure of the gene of tum- transplantation antigen P198: a point mutation generates a new antigenic peptide. *J Exp Med*. 1990 Jul 1;172(1):35-45.
252. De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, et al. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods*. 1997 Jun;12(2):125-42.
253. Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, et al. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science*. 1994 Apr 29;264(5159):716-9.
254. Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol*. 1997 Oct;9(5):684-93.
255. Strausberg RL, Buetow KH, Emmert-Buck MR, Klausner RD. The cancer genome anatomy project: building an annotated gene index. *Trends Genet*. 2000 Mar;16(3):103-6.
256. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):484-7.

257. Parker KC, Bednarek MA, Coligan JE. Scheme for ranking potential HLA-A2 binding peptides based on independent binding of individual peptide side-chains. *J Immunol.* 1994 Jan 1;152(1):163-75.
258. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs [database on the Internet]. Immunogenetics 1999. Available from: www.sypeithi.de.
259. Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, Haderer KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol.* 2000 May 5;298(3):417-29.
260. Celis E, Tsai V, Crimi C, DeMars R, Wentworth PA, Chesnut RW, et al. Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 15;91(6):2105-9.
261. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature.* 1998;357-62.
262. Nusse R, Varmus HE. Wnt genes. *Cell.* 1992 Jun 26;69(7):1073-87.
263. Parr BA, McMahon AP. Wnt genes and vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Aug;4(4):523-8.
264. van Amerongen R, Mikels A, Nusse R. Alternative wnt signaling is initiated by distinct receptors. *Sci Signal.* 2008;1(35):re9.
265. Baksh D, Tuan RS. Canonical and non-canonical Wnts differentially affect the development potential of primary isolate of human bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* 2007 Sep;212(3):817-26.
266. Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS. Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem.* 2004 Dec 15;93(6):1210-30.
267. Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell.* 2000 Oct 13;103(2):311-20.
268. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 1982 Nov;31(1):99-109.
269. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science.* 1996 May 17;272(5264):1023-6.

270. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, et al. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1787-90.
271. Miller JR, Moon RT. Signal transduction through beta-catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev*. 1996 Oct 15;10(20):2527-39.
272. Sakanaka C, Weiss JB, Williams LT. Bridging of beta-catenin and glycogen synthase kinase-3beta by axin and inhibition of beta-catenin-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):3020-3.
273. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, et al. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996 Aug 15;382(6592):638-42.
274. Mao B, Wu W, Li Y, Hoppe D, Stannek P, Glinka A, et al. LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):321-5.
275. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6 / Arrow. *Nat Cell Biol*. 2001;3:683-6.
276. Fedi P, Bafico A, Soria AN, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, et al. Isolation and Biochemical Characterization of the Human Dkk-1 Homologue , a Novel Inhibitor of Mammalian Wnt Signaling *. *The Journal of Biological Chemistry*. 1999;274:19465-72.
277. Fedi P, Bafico A, Nieto Soria A, Burgess WH, Miki T, Bottaro DP, et al. Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19465-72.
278. Bafico A, Liu G, Yaniv A, Gazit A, Aaronson SA. Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat Cell Biol*. 2001 Jul;3(7):683-6.
279. Semenov MV, Tamai K, Brott BK, Kuhl M, Sokol S, He X. Head inducer Dickkopf-1 is a ligand for Wnt coreceptor LRP6. *Curr Biol*. 2001 Jun 26;11(12):951-61.
280. Mukhopadhyay M, Shtrom S, Rodriguez-esteban C, Chen L, Tsukui T, Gomer L, et al. Dickkopf1 Is Required for Embryonic Head Induction and Limb Morphogenesis in the Mouse. *Development*. 2001;1:423-34.
281. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*. 2001 Nov 16;107(4):513-23.

282. Morvan F, Boulukos K, Clement-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssiere B, et al. Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res*. 2006 Jun;21(6):934-45.
283. Wirths O, Waha A, Weggen S, Schirmacher P, Kühne T, Goodyer CG, et al. Overexpression of Human Dickkopf-1 , an Antagonist of wntless / WNT Signaling , in Human Hepatoblastomas and Wilms ' Tumors. *Lab Invest*. 2003;83:429-34.
284. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003 Dec 25;349(26):2483-94.
285. Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, et al. Dickkopf-1 as a Novel Serologic and Prognostic Biomarker for Lung and Esophageal Carcinomas. *Cancer Res*. 2007;2517-25.
286. Hall CL, Daignault SD, Shah RB, Pienta KJ, Keller ET. Dickkopf-1 expression increases early in prostate cancer development and decreases during progression from primary tumor to metastasis. *Prostate*. 2008 Sep 15;68(13):1396-404.
287. Shizhuo W, Tao J, Shulan Z, Bing Z. The expression and significance of Dickkopf-1 in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Biol Markers*. 2009 Jul-Sep;24(3):165-70.
288. Takahashi N, Fukushima T, Yorita K, Tanaka H, Chijiwa K, Kataoka H. Dickkopf-1 is overexpressed in human pancreatic ductal adenocarcinoma cells and is involved in invasive growth. *Int J Cancer*. 2010 Apr 1;126(7):1611-20.
289. Yamashita T, Forgues M, Wang W, Kim JW, Ye Q, Jia H, et al. EpCAM and alpha-fetoprotein expression defines novel prognostic subtypes of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1451-61.
290. Makino T, Yamasaki M, Takemasa I, Takeno A, Nakamura Y, Miyata H, et al. Dickkopf-1 expression as a marker for predicting clinical outcome in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2009 Jul;16(7):2058-64.
291. Yu B, Yang X, Xu Y, Yao G, Shu H, Lin B, et al. Elevated expression of DKK1 is associated with cytoplasmic / nuclear b-catenin accumulation and poor prognosis in hepatocellular carcinomas q. *J Hepatol*. 2009;50:948-57.
292. Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, et al. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1 (DKK-1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene*. 2006;1:4116-21.
293. Gonza M, Aguilera O, Garcı M, Penda N, Pen C, Cal S, et al. The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of b-catenin / TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene*. 2005:1098-103.

294. Berger C, Jensen MC, Lansdorp PM, Gough M, Elliott C, Riddell SR. Adoptive transfer of effector CD8⁺ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest*. 2008 Jan;118(1):294-305.
295. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8⁺ T-cell memory. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:107-19.
296. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8⁺ T cell differentiation during viral infection. *Immunity*. 2007 Sep;27(3):393-405.
297. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):60-6.
298. Kohlmeier JE, Miller SC, Smith J, Lu B, Gerard C, Cookenham T, et al. The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity*. 2008;29:101-13.
299. Hinrichs CS, Borman ZA, Cassard L, Gattinoni L, Spolski R, Yu Z, et al. Adoptively transferred effector cells derived from naïve rather than central memory CD8⁺ T cells mediate superior antitumor immunity. *October*. 2009;106.
300. Hinrichs CS, Borman ZA, Gattinoni L, Yu Z, Burns WR, Huang J, et al. Human effector CD8⁺ T cells derived from naïve rather than memory subsets possess superior traits for adoptive immunotherapy. *Blood*. 2010 Oct 22.
301. Ahmed R, Bevan MJ, Reiner SL, Fearon DT. The precursors of memory: models and controversies. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:662-8.
302. Zhang Y, Joe G, Hexner E, Zhu J, Emerson SG. Host-reactive CD8⁺ memory stem cells in graft-versus-host disease. *Nat Med*. 2005 Dec;11(12):1299-305.
303. Ding S, Wu TY, Brinker A, Peters EC, Hur W, Gray NS, et al. Synthetic small molecules that control stem cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7632-7.
304. Gattinoni L, Zhong X-s, Palmer DC, Ji Y, Hinrichs CS, Yu Z, et al. Wnt signaling arrests effector T cell differentiation and generates CD8⁺ memory stem cells. *Online*. 2009;15:808-14.
305. Reya T, Duncan AW, Ailles L, Domen J, Scherer DC, Willert K, et al. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 2003 May 22;423(6938):409-14.

306. Austin TW, Solar GP, Ziegler FC, Liem L, Matthews W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*. 1997 May 15;89(10):3624-35.
307. Oosterwegel MA, van de Wetering ML, Holstege FC, Prosser HM, Owen MJ, Clevers HC. TCF-1, a T cell-specific transcription factor of the HMG box family, interacts with sequence motifs in the TCR beta and TCR delta enhancers. *Int Immunol*. 1991 Nov;3(11):1189-92.
308. Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R. LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev*. 1991 May;5(5):880-94.
309. Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P, Jay P, van de Weerd BC, Vainio S, et al. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol*. 2001 Jan;31(1):285-93.
310. Okamura RM, Sigvardsson M, Galceran J, Verbeek S, Clevers H, Grosschedl R. Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity*. 1998 Jan;8(1):11-20.
311. Xu Y, Banerjee D, Huelsken J, Birchmeier W, Sen JM. Deletion of beta-catenin impairs T cell development. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1177-82.
312. Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR, et al. Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 28;103(9):3322-6.
313. Lovatt M, Bijlmakers MJ. Stabilisation of beta-catenin downstream of T cell receptor signalling. *PLoS One*. 2010;5(9).
314. Jeannet G, Boudousquie C, Gardiol N, Kang J, Huelsken J, Held W. Essential role of the Wnt pathway effector Tcf-1 for the establishment of functional CD8 T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 25;107(21):9777-82.
315. Zhao DM, Yu S, Zhou X, Haring JS, Held W, Badovinac VP, et al. Constitutive activation of Wnt signaling favors generation of memory CD8 T cells. *J Immunol*. 2010 Feb 1;184(3):1191-9.
316. Markley JC, Sadelain M. IL-7 and IL-21 are superior to IL-2 and IL-15 in promoting human T cell-mediated rejection of systemic lymphoma in immunodeficient mice. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3508-19.
317. Kaneko S, Mastaglio S, Bondanza A, Ponzoni M, Sanvito F, Aldrighetti L, et al. IL-7 and IL-15 allow the generation of suicide gene-modified alloreactive self-renewing central memory human T lymphocytes. *Blood*. 2009 Jan 29;113(5):1006-15.

318. Zhou X, Yu S, Zhao DM, Harty JT, Badovinac VP, Xue HH. Differentiation and persistence of memory CD8(+) T cells depend on T cell factor 1. *Immunity*. 2010 Aug 27;33(2):229-40.
319. Yannelli JR, Hyatt C, McConnell S, Hines K, Jacknin L, Parker L, et al. Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience. *Int J Cancer*. 1996 Feb 8;65(4):413-21.
320. Dudley ME, Nishimura MI, Holt AK, Rosenberg SA. Antitumor immunization with a minimal peptide epitope (G9-209-2M) leads to a functionally heterogeneous CTL response. *J Immunother*. 1999 Jul;22(4):288-98.
321. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, et al. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol*. 1991;147:4047-53.
322. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1191-8.
323. Tarnok A, Ulrich H, Boci J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):6-10.
324. Schlub TE, Badovinac VP, Sabel JT, Harty JT, Davenport MP. Predicting CD62L expression during the CD8+ T-cell response in vivo. *Immunol Cell Biol*. 2010 Feb;88(2):157-64.
325. Jensen GS, Hart AN, Zaske LA, Drapeau C, Gupta N, Schaeffer DJ, et al. Mobilization of human CD34+ CD133+ and CD34+ CD133(-) stem cells in vivo by consumption of an extract from *Aphanizomenon flos-aquae*--related to modulation of CXCR4 expression by an L-selectin ligand? *Cardiovasc Revasc Med*. 2007 Jul-Sep;8(3):189-202.
326. Barcelos LS, Duplaa C, Krankel N, Graiani G, Invernici G, Katore R, et al. Human CD133+ progenitor cells promote the healing of diabetic ischemic ulcers by paracrine stimulation of angiogenesis and activation of Wnt signaling. *Circ Res*. 2009 May 8;104(9):1095-102.
327. Godin-Ethier J, Pelletier S, Hanafi L-A, Gannon PO, Forget M-A, Routy J-P, et al. Human activated T lymphocytes modulate IDO expression in tumors through Th1/Th2 balance. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183:7752-60.
328. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*. 2006 Mar;208(4):495-506.

329. Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, Gulben K. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast*. 2008 Aug;17(4):341-6.
330. Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood M. T1N0 triple negative breast cancer: risk of recurrence and adjuvant chemotherapy. *Breast J*. 2009 Sep-Oct;15(5):454-60.
331. Tan AR, Swain SM. Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer. *Cancer J*. 2008 Nov-Dec;14(6):343-51.
332. Scully R. Role of BRCA gene dysfunction in breast and ovarian cancer predisposition. *Breast Cancer Res*. 2000;2(5):324-30.
333. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002 Jan 25;108(2):171-82.
334. Liu Y, Kulesz-Martin M. p53 protein at the hub of cellular DNA damage response pathways through sequence-specific and non-sequence-specific DNA binding. *Carcinogenesis*. 2001 Jun;22(6):851-60.
335. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990 Dec 21;250(4988):1684-9.
336. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995 Dec 21-28;378(6559):789-92.
337. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002 May 1;20(9):2310-8.
338. Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1 , an inhibitor of the Wnt signaling pathway , is induced by p53. *Oncogene*. 2000.
339. Henderson IC, Patek AJ. The relationship between prognostic and predictive factors in the management of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998;52(1-3):261-88.
340. Voorzanger-Rousselot N, Goehrig D, Journe F, Doriath V, Body JJ, Clezardin P, et al. Increased Dickkopf-1 expression in breast cancer bone metastases. *Br J Cancer*. 2007 Oct 8;97(7):964-70.
341. Hall CL, Bafico A, Dai J, Aaronson SA, Keller ET. Prostate cancer cells promote osteoblastic bone metastases through Wnts. *Cancer Res*. 2005 Sep 1;65(17):7554-60.

342. Zhou XL, Qin XR, Zhang XD, Ye LH. Downregulation of Dickkopf-1 is responsible for high proliferation of breast cancer cells via losing control of Wnt/beta-catenin signaling. *Acta Pharmacol Sin.* 2010 Feb;31(2):202-10.
343. Mikheev AM, Mikheeva SA, Maxwell JP, Rivo JV, Rostomily R, Swisshelm K, et al. Dickkopf-1 mediated tumor suppression in human breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Nov;112(2):263-73.
344. Smadja DM, d'Audigier C, Weiswald LB, Badoual C, Dangles-Marie V, Mauge L, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 increases endothelial progenitor cell angiogenic potential. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2544-52.
345. Hussain M, Rao M, Humphries AE, Hong JA, Liu F, Yang M, et al. Tobacco Smoke Induces Polycomb-Mediated Repression of Dickkopf-1 in Lung Cancer Cells. *Cancer Res.* 2009;3570-8.
346. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006 Apr;4(4):e115.
347. Pukrop T, Binder C. The complex pathways of Wnt 5a in cancer progression. *J Mol Med.* 2008 Mar;86(3):259-66.
348. Sen M, Lauterbach K, El-Gabalawy H, Firestein GS, Corr M, Carson DA. Expression and function of wingless and frizzled homologs in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Mar 14;97(6):2791-6.
349. Sheng SL, Huang G, Yu B, Qin WX. Clinical significance and prognostic value of serum Dickkopf-1 concentrations in patients with lung cancer. *Clin Chem.* 2009 Sep;55(9):1656-64.
350. Yao X, Jiang H, Zhang C, Wang H, Yang L, Yu Y, et al. Dickkopf-1 autoantibody is a novel serological biomarker for non-small cell lung cancer. *Biomarkers.* 2010 Mar;15(2):128-34.
351. Pelletier S, Tanguay AES, Lee AES. TGF-alpha as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer.* 2008.
352. Hirata H, Hinoda Y, Nakajima K, Kawamoto K, Kikuno N, Ueno K, et al. Wnt antagonist DKK1 acts as a tumor suppressor gene that induces apoptosis and inhibits proliferation in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010 Jun 14.
353. Makino T, Yamasaki M, Takemasa I, Takeno A. Dickkopf-1 Expression as a Marker for Predicting Clinical Outcome in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2009;1:2058-64.

354. Zhou Y, Liu F, Xu Q, Wang X. Analysis of the expression profile of Dickkopf-1 gene in human glioma and the association with tumor malignancy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:138.
355. Jiang T, Wang S, Huang L, Zhang S. Clinical significance of serum DKK-1 in patients with gynecological cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2009 Oct;19(7):1177-81.
356. Granchi D, Corrias MV, Garaventa A, Baglio SR, Cangemi G, Carlini B, et al. Neuroblastoma and bone metastases: Clinical significance and prognostic value of Dickkopf 1 plasma levels. *Bone*. 2011 Jan 1;48(1):152-9.
357. Sondergaard TE, Pedersen PT, Andersen TL, Soe K, Lund T, Ostergaard B, et al. A phase II clinical trial does not show that high dose simvastatin has beneficial effect on markers of bone turnover in multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2009 Mar;27(1):17-22.
358. Terpos E, Kastritis E, Roussou M, Heath D, Christoulas D, Anagnostopoulos N, et al. The combination of bortezomib, melphalan, dexamethasone and intermittent thalidomide is an effective regimen for relapsed/refractory myeloma and is associated with improvement of abnormal bone metabolism and angiogenesis. *Leukemia*. 2008 Dec;22(12):2247-56.
359. Hayes DF, Bast RC, Desch CE, Fritsche H, Jr., Kemeny NE, Jessup JM, et al. Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Oct 16;88(20):1456-66.
360. Hsieh JC, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, et al. Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell*. 2003 Feb 7;112(3):355-67.
361. Koduri V, Blacklow SC. Requirement for natively unstructured regions of mesoderm development candidate 2 in promoting low-density lipoprotein receptor-related protein 6 maturation. *Biochemistry*. 2007 Jun 5;46(22):6570-7.
362. Li Y, Chen J, Lu W, McCormick LM, Wang J, Bu G. Mesd binds to mature LDL-receptor-related protein-6 and antagonizes ligand binding. *J Cell Sci*. 2005 Nov 15;118(Pt 22):5305-14.
363. Lu W, Liu CC, Thottassery JV, Bu G, Li Y. Mesd is a universal inhibitor of Wnt coreceptors LRP5 and LRP6 and blocks Wnt/beta-catenin signaling in cancer cells. *Biochemistry*. 2010 Jun 8;49(22):4635-43.
364. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*. 2005 Jul 22;280(29):26770-5.

365. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res.* 2011 Jan;39(Database issue):D913-9.
366. Lapointe R, Bellemare-Pelletier A, Housseau F, Thibodeau J, Hwu P. CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res.* 2003;63:2836–43.
367. Gotter J, Brors B, Hergenhausen M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med.* 2004 Jan 19;199(2):155-66.
368. Castilleja A, Carter D, Efferson CL, Ward NE, Kawano K, Fisk B, et al. Induction of tumor-reactive CTL by C-side chain variants of the CTL epitope HER-2/neu protooncogene (369-377) selected by molecular modeling of the peptide: HLA-A2 complex. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3545-54.
369. World Health 2008.
370. Lepage S, Lapointe R. Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res.* 2006;66:2423-32.
371. Qian J, Xie J, Hong S, Yang J, Zhang L, Han X, et al. Dickkopf-1 (DKK1) is a widely expressed and potent tumor-associated antigen in multiple myeloma. *Blood.* 2007 Sep 1;110(5):1587-94.
372. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price Da, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *The Journal of experimental medicine.* 2007;204:1405-16.
373. Gaucher D, Therrien R, Kettaf N, Angermann BR, Boucher G, Filali-Mouhim A, et al. Yellow fever vaccine induces integrated multilineage and polyfunctional immune responses. *J Exp Med.* 2008 Dec 22;205(13):3119-31.
374. Asporid C, Pedroza-gonzalez A, Gallegos M, Tindle S, Burton EC, Su D, et al. Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13 – secreting CD4 + T cells that facilitate tumor development *The Journal of Experimental Medicine.* Cytokines. 2007;204:1037-47.
375. Stathopoulos GT, Sherrill TP, Karabela SP, Goleniewska K, Kalomenidis I, Roussos C, et al. Host-derived Interleukin-5 Promotes Adenocarcinoma-induced Malignant Pleural Effusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010 Nov 15;182(10):1273-81.
376. Eftimie R, Bramson JL, Earn DJ. Modeling anti-tumor Th1 and Th2 immunity in the rejection of melanoma. *J Theor Biol.* 2010 Aug 7;265(3):467-80.

377. Kyte JA, Trachsel S, Risberg B, Straten P, Lislerud K, Gaudernack G. Unconventional cytokine profiles and development of T cell memory in long-term survivors after cancer vaccination. *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Oct;58(10):1609-26.
378. Johnson LA, Heemskerk B, Powell DJ, Jr., Cohen CJ, Morgan RA, Dudley ME, et al. Gene transfer of tumor-reactive TCR confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6548-59.
379. Chinnasamy N, Wargo JA, Yu Z, Rao M, Frankel TL, Riley JP, et al. A TCR Targeting the HLA-A*0201-Restricted Epitope of MAGE-A3 Recognizes Multiple Epitopes of the MAGE-A Antigen Superfamily in Several Types of Cancer. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):685-96.
380. Vitiello A, Marchesini D, Furze J, Sherman LA, Chesnut RW. Analysis of the HLA-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocyte response in transgenic mice carrying a chimeric human-mouse class I major histocompatibility complex. *J Exp Med*. 1991 Apr 1;173(4):1007-15.
381. Zeng FY, Dong H, Cui J, Liu L, Chen T. Glycogen synthase kinase 3 regulates PAX3-FKHR-mediated cell proliferation in human alveolar rhabdomyosarcoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jan 1;391(1):1049-55.
382. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1784-7.
383. Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2009 May;9(5):324-37.
384. Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. *Cell Stem Cell*. 2009 Sep 4;5(3):279-89.
385. Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, et al. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):108-12.
386. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 1991 Aug 23;253(5022):905-9.
387. Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, Ahmed R. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med*. 2008 Mar 17;205(3):625-40.

388. Romero P, Zippelius A, Kurth I, Pittet MJ, Toubrey C, Iancu EM, et al. Four functionnally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol.* 2007;178:4112-9.

ANNEXE I. Manuscrit

Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer

Neoplasia, 2007 Oct, 9(10): 788-796.

Running title: PDEF in invasive breast cancer

Simon Turcotte^{†}, Marie-Andrée Forget^{*}, Diane Beauseigle^{*}, Edgar Nassif^{†□} and Réjean Lapointe^{*}.**

^{*} Laboratoire d'immuno-oncologie, Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du CHUM – Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada; [†]Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université de Montréal, , Montréal, Québec, Canada; [□] Département de chirurgie oncologie, CHUM – Hôpital Notre-Dame, Montréal, Québec, Canada.

Prostate-Derived Ets Transcription Factor Overexpression is Associated with Nodal Metastasis and Hormone Receptor Positivity in Invasive Breast Cancer¹

Simon Turcotte^{*,†,2}, Marie-Andrée Forget^{*,2}, Diane Beauseigle^{*}, Edgar Nassif^{†,‡} and Réjean Lapointe^{*,2}

^{*}Laboratoire d'immuno-oncologie, Institut du cancer de Montréal, Centre de recherche du CHUM – Hôpital Notre-Dame, Montreal, Quebec, Canada; [†]Département de chirurgie, Faculté de médecine, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; [‡]Département de chirurgie oncologique, CHUM – Hôpital Notre-Dame, Montreal, Quebec, Canada

Abstract

Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) has recently been associated with invasive breast cancer, but no expression profile has been defined in clinical specimens. We undertook a comprehensive PDEF transcriptional expression study of 86 breast cancer clinical specimens, several cell lines, and normal tissues. PDEF expression profile was analyzed according to standard clinicopathologic parameters and compared with hormonal receptor and HER-2/*neu* status and to the expression of the new tumor biomarker Dkkopf-1 (DKK1). Wide ranging PDEF overexpression was observed in 74% of tested tumors, at higher levels than the average expression found in normal breasts. High PDEF expression was associated with hormone receptor positivity ($P < .001$), moderate to good differentiation (less than grade III, $P = .01$), and dissemination to axillary lymph nodes ($P = .002$). PDEF was an independent risk factor for nodal involvement (multivariate analysis, odds ratio 1.250, $P = .002$). It was expressed in a different subgroup compared to DKK1-expressing tumors ($P < .001$). Our data imply that PDEF mRNA expression could be useful in breast cancer molecular staging. Further insights into PDEF functions at the protein level, and possible links with hormone receptors biology, bear great potential for new therapeutic avenues.

Neoplasia (2007) 9, 788–796

Keywords: Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF), Dkkopf-1 (DKK1), breast cancer, expression profile, tumor biomarkers.

which promote or prevent early dissemination or resistance to antiestrogenic therapies, remain to be identified, included as molecular staging tools, and used as new therapeutic targets to personalize breast cancer treatment and improve outcomes.

Epithelial-specific Ets transcription factors could potentially be exploited in this regard [5,6]. Several Ets have been linked mainly to ER-negativity and HER-2/*neu* breast cancer [7–10]. Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF), one of the last Ets identified, was the first to be characterized in hormone-sensitive prostate cancer as a promoter of the protease prostate-specific antigen, in cooperation with androgen receptor and other transcription factors [11,12]. Bioinformatic tools and various gene expression quantification methods subsequently documented PDEF mRNA overexpression in invasive breast cancer [13], in atypical ductal hyperplasias, and in carcinomas *in situ* [14], when compared to normal breasts. PDEF mRNA has also been detected in micrometastatic axillary lymph nodes [15]. Despite high mRNA expression, immunohistochemical data suggest that PDEF protein expression could be lost in prostate and breast carcinomas [16,17]. PDEF silencing and overexpression assays in breast and prostate metastatic cancer cell lines resulted in antimetastatic effects [18–20], but prometastatic effects has also been documented in other metastatic- and benign disease-derived breast cell lines [14].

Up to now, however, the PDEF expression profile has not been described, at the mRNA level, in clinical breast cancer specimens. In order to orient future work at the protein level,

Introduction

Genome-wide expression profiles have provided a genotypic ground that supports the main invasive breast cancer phenotypes, namely, the estrogen receptor (ER)-positive luminal epithelial type, the ER-negative basal epithelial type, and breast carcinoma overexpressing the HER-2/*neu* receptor [1]. ER-positive tumors form the largest group of breast cancers, but encompass heterogeneous tumors of variable aggressiveness [2–4]. ER-positive tumor-specific genes,

Abbreviations: DKK1, Dkkopf-1; ER, estrogen receptor; PDEF, prostate-derived Ets transcription factor; ROC, receiver–operator curve; RT-PCR, reverse transcription–polymerase chain reaction

¹This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the FRSQ Cancer Network, and La Fondation du CHUM.

²R.L. is the recipient of a Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ) scholarship. S.T. and M.-A.F. are recipients of studentships from the Canderel Fund of the Institut du Cancer de Montréal. M.-A.F. is recipient of a FRSQ Ph.D. studentship.

Received 7 June 2007; Revised 8 August 2007; Accepted 10 August 2007.

Copyright © 2007 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/07/\$25.00
DOI 10.1593/neo.07460

we report a comprehensive PDEF transcriptional expression study of 86 breast cancer clinical specimens, several cell lines, and normal tissues. PDEF expression profile was analyzed according to standard clinicopathologic parameters, compared with hormonal receptor and HER-2/*neu* status, and to the expression of the new tumor biomarker Dkkopf-1 (DKK1). We observed that PDEF expression is strongly associated with the ER-positive breast cancer phenotype and that PDEF mRNA overexpression in primary tumors could also be an independent risk factor for cancer dissemination to lymph nodes.

Materials and Methods

Patient Specimens and Cell Lines

Breast cancer tissues of consecutive patients who had provided written consent to contribute to the CHUM-FRSQ Tumor Bank (Montreal, QC, Canada) between September 2003 and February 2006 were selected by the pathologist after surgical resection of tumors 1.5 cm or greater in diameter. The recruitment protocol and management of clinical specimens and information were previously approved by institutional authorities. Fresh tissues were stored at 4°C in RNeasy Lysis Buffer (Qiagen, St. Louis, MO) for RNA stabilization. All patients underwent sentinel node dissection and, when positive for nodal metastasis, complete axillary lymph node dissection. Cell lines used for the first detection of PDEF at the mRNA and protein levels (breast cancer MCF7, MDA-MB-231, BT-20, HCC-1428, HCC-2218, renal embryonic 293T, and melanoma SK23) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured in RPMI 1640 (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) supplemented with 10% heat-inactivated FBS, 100 U/ml penicillin/streptomycin (both from Wisent), 2 mM L-glutamine, and 10 µg/ml gentamicin (both from Invitrogen, Grand Island, NY). HCC breast cancer lines also required 10 mM Hepes solution plus 1 mM sodium pyruvate (both from Invitrogen). Mononuclear cells were obtained by patient blood centrifugation on a lymphocyte separation medium (Cellgro, Herndon, VA) and culture in complete AIM-V medium (Invitrogen), as described previously [21].

RNA Extraction and Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Cancer specimens were homogenized with Medimachine (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was extracted with a reagent (Qiazol; QIAGEN GmbH, Hilden, Germany), followed by a cleanup and concentration procedure, using the RNeasy Mini or Micro Kit (QIAGEN) and stored at –80°C. Five of 91 clinical specimens were rejected because of poor quality of the extracted mRNA (OD₂₆₀/OD₂₈₀ absorption ratio below 1.6) or a β-actin expression level detected beyond the last dilution of the standard curve when tested in real-time PCR (see below). A panel of pooled mRNA from 19 normal tissues and 6 peritumoral normal breast mRNA were also analyzed (both from Clontech, Mountain View, CA).

We synthesized cDNA from 1 µg of mRNA with the Omniscript Reverse Transcriptase (RT) Kit (QIAGEN), using oligo-dT (Invitrogen) at 42°C for 1 hour. Intron-spanning PCR primer pairs were designed for PDEF (5' primer GACATCGA-GACGGCCTGCAAGCTG; 3' primer ACATGGCGCACAGCTCCTTG; amplicon 150 bp) and for β-actin, exploited as a housekeeping gene (5' primer GGAAGGCTGGAAGAGTGCC; 3' primer GTGATGGTGGGC ATGGGT C; amplicon 300 bp) (Invitrogen). PCR was performed with the Quantitect SYBR Green PCR kit (QIAGEN). Optimal annealing temperatures for both PDEF and β-actin were determined by a gradient (51–65°C). Real-time quantitative RT-PCR was performed with 0.4 µM of each PDEF primer or 0.8 µM of each β-actin primer, 6.25 µl of 2× SYBR Green mix (providing 2.5 mM MgCl₂), 2.5 µl of cDNA (1:25 dilution), and water in a thermal cycler (Rotorgene 3000; Corbett Life Science, Sydney, Australia). The optimized cycling conditions were 10 minutes at 95°C for the initial polymerase activation, then 32 cycles for 40 seconds at 94°C, 40 seconds at 56°C, 50 seconds at 72°C, and a final melting curve from 72 to 95°C. Fluorescence was measured at the end of each extension step. The gain was adjusted automatically on the first tube at the end of the first cycle (channel FAM/SYBR, source 470 nm, detector 510 nm, gain adjusted between 2 and 5 fluorescence). The absence of primer dimers and the specificity of the PCR products were documented by melting curve analysis and electrophoresis migration in 2% agarose gel stained with ethidium bromide.

PDEF Quantification

The relative PDEF expression ratio over β-actin was reported in relation to MCF7 cell line expression established at a value of 1 [22]. The equation takes into account the PCR efficiencies (*E*) of both genes and the difference (Δ) between the moment at which the fluorescence of a given sample *versus* MCF7 crosses the threshold (*C_t*). The equation is as follows:

$$\text{Ratio PDEF}/\beta\text{-actin} = (E_{\text{PDEF}})^{\Delta C_t(\text{MCF7-sample}) \text{ for PDEF}} / (E_{\beta\text{-actin}})^{\Delta C_t(\text{MCF7-sample}) \text{ for } \beta\text{-actin}}$$

Standard curves were generated every two runs with serial dilutions of a pool of cDNA taken from the above-mentioned breast cancer cell lines. The curves allowed the software from Corbett to calculate the lowest thresholds of the log-linear amplification phase above the fluorescence background and the efficiencies of PCRs derived from the high linearity slopes (Pearson correlation coefficient *r* > 0.99). Mean thresholds and efficiencies were used to compare the expression of all samples. *C_t* obtained at or after the last detectable point of the dilution curves (1:3125 for PDEF and 1:15,625 for β-actin) was considered negative. All samples were tested in duplicate in at least two independent runs, whereas MCF7 and the controls (MCF7 without RT, water, or lymphocytes) were systematically included in every run. Intra- and interassay *C_t* variations, calculated with the Relative Expression Software Tool, are represented by error bars [23].

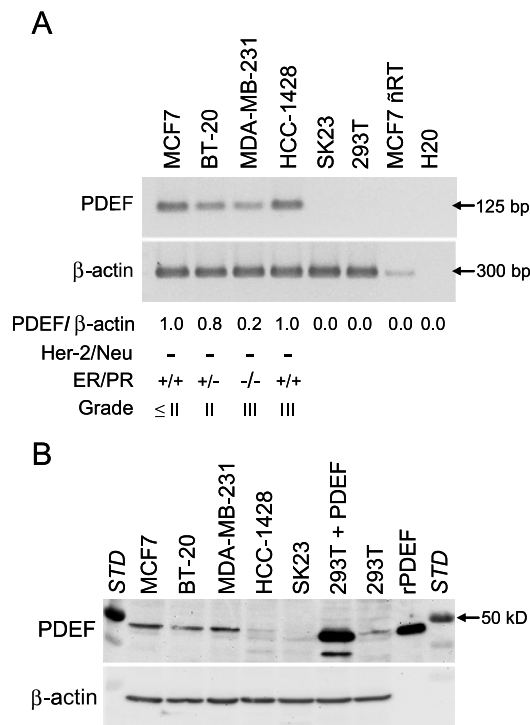


Figure 1. PDEF mRNA and protein expression in cancer cell lines. (A) Migration of PDEF amplicon obtained in cancer cell lines by real-time RT-PCR, with relative quantification (PDEF/β-actin, if MCF7 = 1.0). Four cell lines derived from metastatic breast cancer (MCF7, BT-20, MDA-MB-231, and HCC-1428) figure with SK23 melanoma, and 293T renal embryonic cells used as negative controls. (B) PDEF expression at the protein level by Western blot analysis. All results are representative of at least three independent experiments. ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor; -RT, without reverse transcription; rPDEF, recombinant PDEF; 293T + PDEF, 293T cells transfected with PDEF.

DKK1 Expression Measurements and Quantification

Real-time RT-PCR with intron-spanning DKK1 primers was performed in a thermal cycler (LightCycler; Roche, Mannheim, Germany) and revealed with SYBR Green (QIAGEN) as described previously [24]. cDNA was synthesized as described for PDEF, from the same RNA extracts, tested at the same time period, and the amplified material was submitted to the same specificity validation as PDEF.

Measurement of PDEF Protein Expression

For Western blot analysis, protein extracts were prepared from the above-mentioned cell lines for 20 minutes in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 1 mM Na₃VO₄, and 2 mM EDTA) containing protease inhibitors (1 mM PMSF, 2 μM pepstatin A, and 2 μM leupeptin, all from Sigma). Protein concentration was measured by Lowry's assay with a DC Protein Assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA). For recombinant PDEF, the coding sequence was cloned in pQE-30 (QIAGEN) and the recombinant protein was produced in *Escherichia coli* DH5-α. Cell extracts (10 μg/well), resolved by 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, were transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Immun-Blot, Bio-Rad). The membranes were subjected to 1-hour incubation with rabbit affinity-purified polyclonal anti-PDEF antibody

(1:400), kindly provided by Dr. Dennis K. Watson (Hollings Cancer Center, Charleston, SC) [16], or with mouse actin-specific antibody (1:4000; Chemicon, Temecula, CA). The membranes were then washed and proteins revealed after a 1-hour incubation with secondary peroxidase-conjugated antibodies (1:5000 goat anti-rabbit from Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA; 1:40,000 goat anti-mouse antibody from Chemicon) were detected with a reagent (ECL Plus; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Chemifluorescence was quantified with an imaging system (Omega 12ic; Ultralum, Claremont, CA).

Statistical Analysis

Associations between PDEF continuous expression and categorical clinicopathologic parameters were evaluated by the independent-sample *t* test or by the one-way analysis of variance (if more than two categories, with previous Levine test to ensure the homogeneity of variance). PDEF versus DKK1 proportions clustered by clinicopathologic factors were compared by the Pearson chi-square test or Fisher's exact test for small samples. These tests were done using a software for Windows (SPSS 13.0; LEAD Technologies, Chicago, IL), with the generation of receiver-operator curves (ROCs) to evaluate the sensitivity of PDEF expression for the prediction of clinicopathologic factors. Univariate and multivariate logistic regressions were used to compare the strength of associations between PDEF continuous expression and metastatic lymph node involvement. Logistic regression analysis was performed with software R, version 2.3.1, with the deviance test for multivariate analysis (The R project for statistical computing [http://www.r-project.org]).

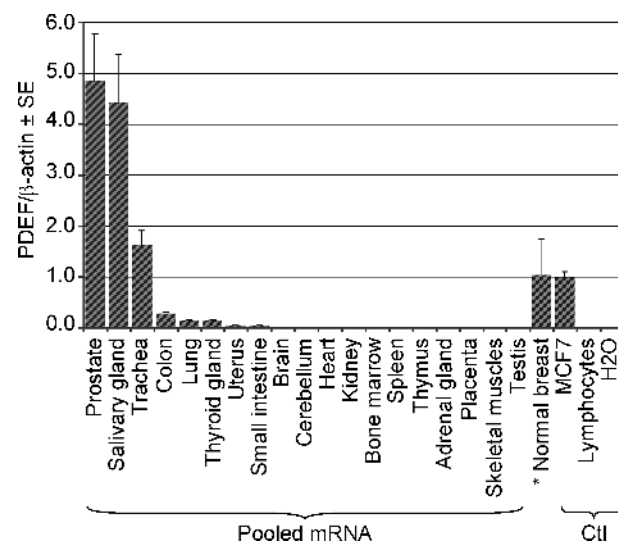


Figure 2. PDEF expression in normal tissues. PDEF mRNA expression of a panel of 19 mRNA pools of normal tissues. *"Normal breast" corresponds to the average level of six normal peritumoral breast tissues taken from patients operated on for breast cancer. Controls (Ctl) include the MCF7 breast cancer cell line and lymphocytes taken from the blood of breast cancer patients who contributed to the CHUM-FRSQ Tumor Bank. The error bars represent the intra- and interassay Ct variations, calculated with the Relative Expression Software Tool, except for the normal breast, where it represents the standard deviation of the six samples tested.

All tests were two-sided and P values $< .05$ were regarded as statistically significant.

Results

PDEF mRNA and Protein Expression in Breast Cancer Cell Lines

PDEF expression at the mRNA and protein levels was first evaluated in four breast cancer cell lines (Figure 1). The ER-negative MDA-MB-231 breast cancer cell line expressed the lowest PDEF level, five times lower than other ER-positive lines. As reported previously, protein detection did not always follow mRNA levels [16,17]. For further PDEF

mRNA expression analysis of clinical specimens, the MCF7 expression level was chosen as a reference because it corresponded to the median PDEF/ β -actin expression level in breast cancer cell lines and is widely available.

PDEF mRNA is Weakly or Not Detected in Vital Organs

PDEF expression was previously reported by different quantification methods in some high epithelial content tissues, namely, the prostate, salivary glands, colon, and normal breast [11,13,16]. We reassessed PDEF expression in normal tissues to compare its magnitude with PDEF expression in breast cancer by a reproducible method (Figure 2). Besides weak expression in the lungs and colon, PDEF was not detected in other vital organs, such as the heart, brain, and

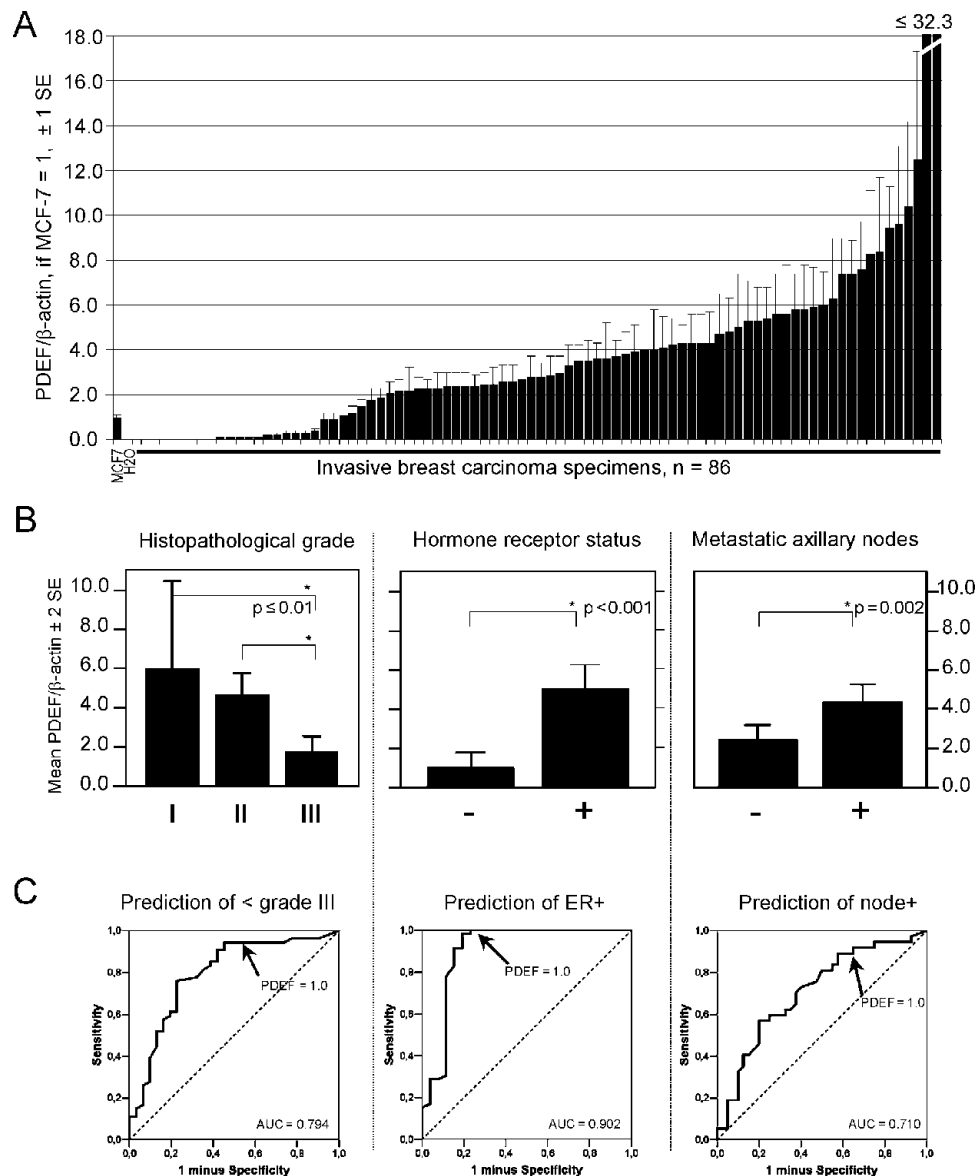


Figure 3. PDEF expression in invasive breast carcinoma. (A) PDEF expression in 86 tested clinical samples. Sixty-four tumors were found to express PDEF at a level at least equal to the MCF7 breast cancer cell line. (B) Higher PDEF expression was associated with moderate to well-differentiated (grades I and II) tumors, with hormone receptor positivity (estrogen and/or progesterone), and with metastatic nodal involvement at the time of surgery. The same scale was used for the three graphs. (C) Receiver–operator curves (ROCs) allowed the determination of the sensitivity and specificity at which the PDEF expression level was positively associated with the three clinicopathological factors illustrated in (B). The MCF7 expression level (PDEF = 1) is indicated by arrows. AUC, area under the curve; SE, standard error.

kidneys. Mean PDEF expression in six peritumoral breast tissues was 1.04 ± 0.68 , a level similar to MCF7. PDEF was absent from lymphocytes that often infiltrate solid tumors. Altogether, the absence of PDEF expression in most normal tissues and vital organs represents an essential prerequisite for the validation of future tumor biomarker or antigen.

Measurement of PDEF in Breast Cancer Clinical Specimens

PDEF expression in breast cancer cell lines, which are free of normal epithelium, combined with a similar level of expression in peritumoral normal breasts, called for a comprehensive PDEF transcriptional analysis of breast cancer clinical specimens. We were able to extract sufficient RNA from 86 of 91 consecutive tumors. Mean patient age at

diagnosis was 64.5 years, and the majority presented with moderately differentiated, sporadic, invasive ductal carcinomas. Among the 86 tumors, 64 (74.4%) were found to express PDEF at a level at least equal to the established MCF7 breast cancer cell line, and higher than the normal breast average expression level (Figure 3A). PDEF expression ranged from 0 to 32 times higher than MCF7. Mean PDEF expression in all tumors was 3.76 ± 4.46 , with a median of 2.80.

Cluster Analysis of PDEF By Clinicopathologic Parameters

Table 1 summarizes the clinicopathologic parameters of patients and their tumors as well as the significance of the different average PDEF expression cluster levels. Overall,

Table 1. PDEF Expression and Clinicopathological Factors of 86 Invasive Breast Cancers.

Clinicopathological Characteristics	Frequencies*		PDEF Expression and Association with Clinicopathological Factors		
	N	(%)	Mean	95% CI	P [†]
Age					
< 50	15	(17.6)	2.6	1.4–3.7	.516
50 to 70	36	(42.4)	4.1	2.9–5.3	
> 70	34	(40.0)	3.9	1.8–6.0	
Primary or relapse					
Primary	68	(79.1)	3.2	2.5–3.9	.278
Recurrence	10	(11.6)	7.5	0.2–14.8	
Second primary, contralateral	8	(9.3)	4.0	1.7–6.2	
Familial history					
No	60	(69.8)	4.4	3.1–5.7	.060
Yes	26	(30.2)	2.4	1.4–3.4	
Histology					
Ductal	66	(76.7)	3.4	2.6–4.3	.267
Lobular	13	(15.1)	5.7	0.6–10.7	
Other	7	(8.1)	3.6	0.6–6.7	
Histopathological grade [‡]					
I (good)	13	(15.1)	6.0	1.1–10.9	.003**
II (moderate)	41	(47.7)	4.6	3.5–5.8	
III (poor)	31	(36.0)	1.7	0.9–2.5	
Tumor size					
T1 (≤ 2 cm)	33	(38.4)	3.6	1.7–5.6	.614
T2 (2.1–5 cm)	46	(53.5)	4.1	3.0–5.2	
T3 (> 5 cm)	7	(8.1)	2.3	0.1–4.6	
Metastatic axillary nodes [§]					
Negative	40	(46.5)	2.4	1.6–3.2	.002
Positive	37	(43.0)	4.3	3.4–5.3	
Combined staging (American Joint Committee on Cancer)					
I	20	(23.3)	2.3	1.5–3.2	$\leq .003^{††}$
IIA	28	(32.6)	2.7	1.7–3.8	
IIB	16	(18.6)	5.8	4.2–7.3	
IIIA	8	(9.3)	3.1	0.7–5.5	
IIIC	5	(5.8)	3.4	–0.3–7.1	
Estrogen receptor status [¶]					
Negative	31	(36.0)	2.0	0.6–3.4	.003
Positive	54	(62.8)	4.9	3.6–6.1	
Progesterone receptor status [¶]					
Negative	37	(43.0)	2.0	1.1–2.9	.001
Positive	48	(55.8)	5.2	3.8–6.7	
HER-2/ <i>neu</i> overexpression [#]					
Negative	73	(84.9)	4.0	2.9–5.2	.596
Positive	5	(5.8)	2.9	–0.5–6.3	

PDEF, prostate-derived Ets transcription factor; CI, confidence interval.

*Data do not always add up to 86 due to missing values.

[†]P value of Student's *t* test for independent samples or one-way ANOVA when there was more than two categorical variables.

[‡]Scarff Bloom and Richardson classification, combined grade.

[§]Nodal status is dichotomized since only 11 tumors were associated with four or more nodes (N2 and N3).

[¶]Immunohistochemical classification.

[#]Immunohistochemical classification (TAB 250 and CB11) confirmed by fluorescent *in situ* hybridization when doubtful.

**Average PDEF expression of grade III tumors is significantly lower than grade II or I.

^{††}Average PDEF expression of stage IIB is higher than stage I or IIB tumors, but not significantly different from stage III tumors.

Table 2. Univariate and Multivariate Analyses of Metastatic Nodal Involvement in the Set of Clinical Samples Tested for PDEF Expression.

Clinicopathological Characteristics	Univariate		Multivariate*	
	P	Odds Ratio (95% CI)	P	Odds Ratio (95% CI)
PDEF expression (continuous)	.002	1.34 (1.10–1.62)	.002	1.250 (1.004–1.540)
Differentiation, grade III vs I and II	.08	0.41 (0.14–1.08)	.42	0.51 (0.14–1.88)
Tumor size, > 2 cm vs ≤ 2 cm	.03	3.12 (1.12–8.70)	.10	2.75 (0.89–8.34)
HER-2/ <i>neu</i> , positive vs negative	.93	1.09 (0.14–8.25)	.48	2.38 (0.21–27.00)

CI, confidence interval.

*The multivariate model included 69 tumors, with 8 recurrent tumors for women who had already undergone axillary dissection for the primary tumor, 8 missing values for HER-2/*neu*, and 1 missing tumor grade.

these results provide an association between PDEF expression and sporadic epithelial ER-positive breast cancers that are better differentiated (histopathological grades I and II) than ER-negative tumors (Figure 3B). At the time of diagnosis, breast cancer can be regionally disseminated to the axillary lymph nodes. PDEF overexpression in the primary tumor was associated with these more advanced node-positive tumors (Figure 3B). No association was found with

patient age, tumor size, ductal, or lobular histological type. The limited number of recurrent tumors and tumors overexpressing HER-2/*neu* did not yield statistical significance.

PDEF Expression is Strongly Associated with Hormone Receptor Status

We observed that seven patients who presented an ER-positive primary tumor and who had taken a 5-year course of

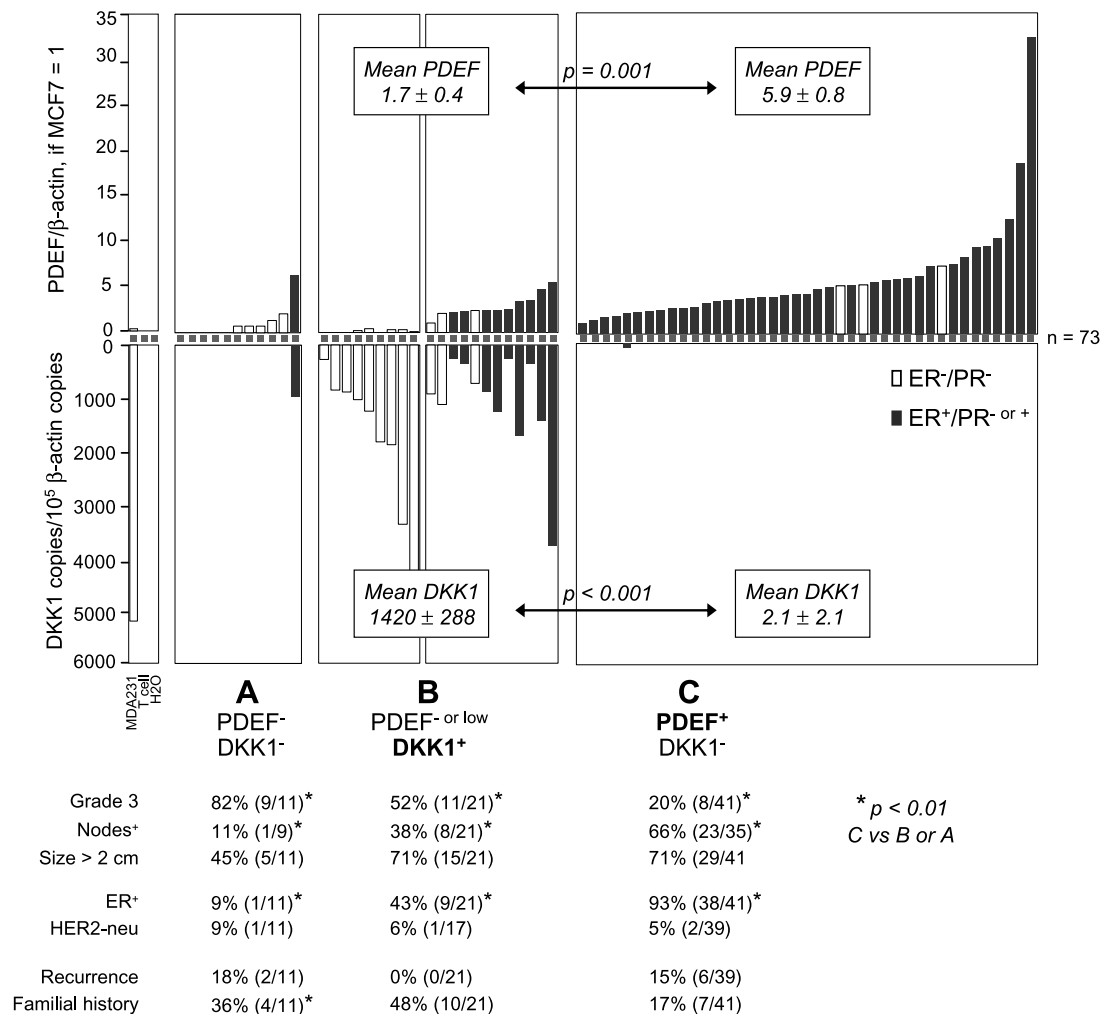


Figure 4. PDEF and DKK1 differential expression pattern. PDEF (upper charts) and DKK1 (lower charts) transcriptional expression are presented in three groups. Group A comprises less differentiated, hormone receptor–negative tumors. DKK1 is overexpressed in Group B, with concomitant null or weak PDEF expression. Group C corresponds to tumors in which PDEF is overexpressed. Compared with Groups A and B, Group C tumors more frequently involve axillary lymph nodes (Nodes⁺), although better differentiated (less than grade III) and hormone receptor–positive. ER, estrogen receptor; MDA231, breast cancer cell line (experimental control); PR, progesterone receptor; T cell, T lymphocytes.

antiestrogen therapy (Tamoxifen) to prevent tumor recurrence nevertheless relapsed with ER-positive tumors coexpressing PDEF. The mean PDEF expression in these tumors was 8.1, but the sample size was insufficient to reach statistical significance (data not shown). Among all tumors expressing PDEF, only 10 did not express ER, further reinforcing a close link between ER and PDEF. We then generated a ROC analysis to appreciate the sensitivity and specificity at which PDEF expression could predict an association with hormone receptor positivity (Figure 3C). As expected from the five times higher mean PDEF expression in hormone receptor–positive tumors (Figure 3B), the ROC analysis allowed us to predict hormone receptor positivity with 98.3% sensitivity (58/59) and 76.9% specificity (20/26), when PDEF was at or above the MCF7 level. These findings all suggest a strong association between PDEF and the hormone receptor–positive phenotype of breast cancer.

PDEF Overexpression is an Independent Risk Factor for Cancer Dissemination to Axillary Lymph Nodes

The ROC generated for the prediction of nodal involvement was less discriminatory than for hormone receptors (Figure 3C). We, however, compared the strength of this association to standard pathological characteristics, because regional dissemination of cancer to lymph nodes is the strongest predictor of recurrence and death from breast cancer. Univariate analysis revealed that PDEF expression was a better predictor of nodal involvement than the degree of differentiation, tumor size and HER-2/*neu* status (Table 2). Continuous PDEF expression remained the only significant independent risk factor in multivariate logistic regression analysis. In this model, sensitivity and specificity were 87.8% (29/33) and 38.8% (14/36), respectively. The associated positive predictive value was 56.9% (29/51), and the negative predictive value, 77.8% (14/18). The odds of presenting nodal metastasis at the time of surgical management were hence increased by 25% for each one-point elevation of PDEF expression (odds ratio 1.250, 95% confidence interval 1.004–1.540, $P = .002$). PDEF expression in the primary tumor thus appeared to be of interest as a molecular staging tool.

PDEF and DKK1 Expressions Delineated Different Subgroups of Aggressive Breast Cancers

The secreted protein DKK1, involved in the Wnt/ β -catenin canonical pathway, is emerging as a biomarker of shorter cancer survival [25]. We recently reported that DKK1 was preferentially expressed, at the transcriptional level, in the aggressive subgroup of ER-negative invasive breast cancers [24]. Since it was recently documented that PDEF could modulate the Wnt/ β -catenin pathway [19], we wanted to compare the PDEF and DKK1 expression profiles. PDEF expression was effectively lower in DKK1-expressing tumors (1.7 ± 1.4 vs 5.9 ± 3.2 , $P < .001$) (Figure 4), and DKK1 was not detected among high PDEF-expressing tumors. It was confirmed that PDEF was expressed in a different subgroup of tumors than DKK1. PDEF-expressing tumors were better differentiated (lower than grade III, $P = .01$); a higher pro-

portion expressed ER (93% vs 43%, $P = .001$) and were disseminated to axillary lymph nodes (66% vs 38%, $P = .01$). In summary, PDEF and DKK1 could delineate distinct aggressive subgroups of invasive breast cancers. The prognostic significance of DKK1 and PDEF in terms of disease-free survival and overall survival remains to be evaluated.

Discussion

This is the first study to assess the expression profile of PDEF, measured as a continuous variable, by a highly reproducible quantification method, in a substantial number of clinical specimens, characterized for classic clinicopathologic parameters. The first main finding was the strong association between PDEF and the hormone receptor–positive breast cancer phenotype. The second was that high PDEF mRNA expression in the primary tumor was associated with a higher risk of regional metastasis to the lymph nodes, which remains the most important prognostic factor for survival at the time of breast cancer diagnosis.

High PDEF mRNA expression needs to be interpreted in relation to low PDEF protein expression found in prostate and breast carcinomas, when compared to normal tissues [16,17,20]. Specifically for breast cancer, immunohistochemical nuclear staining of PDEF was shown to be higher in the peritumoral normal breast epithelium compared to carcinoma cells of all differentiation grades, among 7 and 14 clinical samples [16,20]. These authors noted the near absence of PDEF in the less differentiated grade III tumors. PDEF protein expression was unfortunately not compared with respective mRNA expression or ER status in the clinical samples tested, which limits comparison with our study.

Several observations can, however, be made. We have described significantly low PDEF mRNA expression in grade III tumors when compared to grades I and II (Figure 3B), which appears consistent with a PDEF downregulation and low protein detection in grade III tumors. This is reconcilable with a scheme of epithelial to mesenchymal transition to neoplasia, in which PDEF expression could be lost during cancer progression. However, we cannot exclude that the majority of the few clinical specimens stained for PDEF was ER-negative in the studies cited. Low PDEF protein detection could also reflect the expected low PDEF transcription level in this ER-negative tumor phenotype, as we have observed at the mRNA level.

Nevertheless, low PDEF mRNA expression in normal breasts still translates into high protein nuclear detection [16]. Furthermore, low PDEF mRNA expression in breast cancer cell lines can be associated with sizeable protein expression (see MDA-MB-231, Figure 1), and high PDEF mRNA expression, with barely detectable protein (see HCC-1428, Figure 1). If PDEF is not mutated in cancer cells, it suggests the occurrence of posttranscriptional mechanisms, such as protein cleavage, homo- or heterodimerization, as reported for other Ets factors [6], fast degradation due to two sequences rich in proline, glutamic acid, serine, and threonine motifs contained in PDEF [11], or cytoplasmic instead of nuclear pooling [20]. If PDEF would qualify as a therapeutic target, it would

further be important to investigate its protein expression in low PDEF mRNA normal tissues, such as the lungs and colon (Figure 2).

The link between PDEF and cell motility has been the subject of recent publications. In clinical samples, we observed an increased risk of nodal metastasis when PDEF was highly transcript in the primary tumor (Figure 3B and Table 2). Other groups have documented PDEF mRNA overexpression in breast cancer micro- and macrometastasis to lymph nodes [15,26]. These data suggest that PDEF can be transcribed in invasive breast cancer and that PDEF could have a role in molecular staging, provided that an impact on patient survival would be further demonstrated prospectively and have an impact on clinical decision making. Considering the heterogeneity of breast cancers presenting lymph node metastasis, it is too speculative to think that the altered expression of one gene alone could accurately predict nodal involvement from a primary tumor sample. We believe that the potential role of PDEF in molecular staging lies in multigene predictive models [3,27].

The association between PDEF mRNA overexpression and nodal metastasis has to be discussed in light of the recent work done on cell migration. Most studies have concluded that PDEF was antimetastatic [16,18–20]. In short, PDEF overexpression in transfected cell lines derived from approximately eight breast or prostate cancer metastases resulted in decreased cell migration, loss of pseudopods, spheroid–morphological changes, and increased proportion of cells in the G₀ phase of the cell cycle. Opposite effects were observed in PDEF knockdown cells (small interfering RNA). Some underlying genetic mechanisms were also proposed to support the decrease in cell invasiveness, conditioned by PDEF, namely, the reduced urokinase plasminogen activator and increased Maspin [16], Survivin downregulation [20], and interaction with the transforming growth factor- β pathway [19]. In contrast, PDEF overexpression yielded prometastatic effects in transfected normal endothelial cells, in normal breast cells, in the MCF10A benign breast fibrocystic disease, in four pleural metastasis–derived breast cancer cell lines, in one melanoma, and in one colon cancer cell line [14]. Interestingly, coexpression of PDEF and activated receptor tyrosine kinase Her-2/*neu*, or colony-stimulating factor receptor, synergistically enhanced MCF10A metastatic attributes. How can the apparent bimodal, anti-, and prometastatic effects of PDEF be explained?

Three aspects may be considered in this regard. First, the loss of PDEF protein expression, combined with high PDEF mRNA expression, could be a stronger marker of prometastatic characteristics in advanced breast cancers. Secondly, PDEF overexpression in lower-grade tumor, as well as in normal breast, may participate in the initiation or progression of early breast cancer. In fact, most antimetastatic results have been documented in MDA-MB-231 mesenchymal-like, ER- and HER-2/*neu*–negative pleural metastasis breast cancer cell lines [16,18], and in the PC-3 androgen-independent prostate cancer bone metastasis cell line [19]. Conversely, convincing prometastatic effects were noted in the benign breast disease MCF10A cell line [14]. Finally,

PDEF may function as a transcription activator or repressor, contingent on the cellular context, particularly through cooperation with hormone receptors [11] and the extracellular-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase signaling pathway.

In conclusion, the PDEF transcriptional expression profile in clinical samples suggests potential uses in molecular staging, possibly for the heterogeneous subgroup of ER-positive tumors, and for early lymph node metastasis diagnostic purposes. Further findings on PDEF protein biology are needed to conclude if PDEF could represent an appropriate therapeutic target.

Acknowledgements

We thank Robert Boileau (Research Centre, CHUM) and Ali Filali (Anne-Marie Mes-Masson's laboratory, Research Centre, CHUM) for statistical assistance, Urszula Kzemien for the management of CHUM-FRSQ Tumor Bank, all contributing surgeons (Hôpital Notre-Dame and Hôtel-Dieu, CHUM), Jean-Simon Diallo (Anne-Marie Mes-Masson's laboratory, Research Centre, CHUM) for PCR optimization, and Ovid Da Silva (Research Support Office, Research Centre, CHUM) for text editing.

References

- [1] Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747–752.
- [2] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, et al. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 10869–10874.
- [3] Esteva FJ, Sahin AA, Cristofanilli M, Coombes K, Lee S-J, Baker J, Cronin M, Walker M, Watson D, Shak S, et al. (2005). Prognostic role of a multigene reverse transcriptase–PCR assay in patients with node-negative breast cancer not receiving adjuvant systemic therapy. *Clin Cancer Res* **11**, 3315–3319.
- [4] Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, et al. (2006). Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **24**, 3726–3734 (Epub 2006 May 23).
- [5] Feldman RJ, Sementchenko VI, and Watson DK (2002). The epithelial-specific Ets factors occupy a unique position in defining epithelial proliferation, differentiation and carcinogenesis. *Anticancer Res* **23**, 2125–2132.
- [6] Oikawa T (2004). Ets transcription factors: possible targets for cancer therapy. *Cancer Sci* **95**, 626–633.
- [7] Kurpios NA, Sabolic NA, Sheperd TG, Fidalgo GN, and Hassell JA (2003). Function of PEA3 Ets transcription factors in mammary gland development and oncogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**, 177–190.
- [8] Man AK, Young LJ, Tynan JA, Lesperance J, Egeblad M, Werb Z, Hauser CA, Muller WJ, Cardiff RD, and Oshima RG (2003). Ets2-dependent stromal regulation of mouse mammary tumors. *Mol Cell Biol* **23**, 8614–8625.
- [9] Behrens P, Rothe M, Wellmann A, Krischler J, and Wernert N (2001). The Ets-1 transcription factor is up-regulated together with MMP 1 and MMP 9 in the stroma of pre-invasive breast cancer. *J Pathol* **194**, 43–50.
- [10] Scott GK, Chang CH, Erny KM, Xu F, Fredericks WJ, Rauscher FJ, Thor AD, and Benz CC (2000). Ets regulation of the erbB2 promoter. *Oncogene* **19**, 6490–6502.
- [11] Oettgen P, Finger E, Sun Z, Akbarali Y, Thamrongsak U, Boltax J, Grall F, Dube A, Weiss A, Brown L, et al. (2000). PDEF, a novel prostate epithelium-specific Ets transcription factor, interacts with the androgen receptor and activates prostate-specific antigen gene expression. *J Biol Chem* **275**, 1216–1225.

- [12] Fowler M, Borazanci E, McGhee L, Pylant SW, Williams BJ, Glass J, Davis JN, and Meyers S (2006). RUNX1 (AML-1) and RUNX2 (AML-3) cooperate with prostate-derived Ets factor to activate transcription from the PSA upstream regulatory region. *J Cell Biochem* **97**, 1–17.
- [13] Ghadersohi A and Sood AK (2001). Prostate epithelium-derived Ets transcription factor mRNA is overexpressed in human breast tumors and is a candidate breast tumor marker and a breast tumor antigen. *Clin Cancer Res* **7**, 2731–2738.
- [14] Gunawardane RN, Sgroi DC, Wrobel CN, Koh E, Daley GQ, and Brugge JS (2005). Novel role for PDEF in epithelial cell migration and invasion. *Cancer Res* **65**, 11572–11580.
- [15] Mitas M, Mikhitarian K, Hoover L, Lockett MA, Kelley L, Hill A, Gillanders WE, and Cole DJ (2002). Prostate-specific Ets (PSE) factor: a novel marker for detection of metastatic breast cancer in axillary lymph nodes. *Br J Cancer* **86**, 899–904.
- [16] Feldman RJ, Sementchenko VI, Gayed M, Fraig MM, and Watson DK (2003). PDEF expression in human breast cancer is correlated with invasive potential and altered gene expression. *Cancer Res* **63**, 4626–4631.
- [17] Nozawa M, Yomogida K, Kanno N, Nonomura N, Miki T, Okuyama A, Nishimune Y, and Nozaki M (2000). Prostate-specific transcription factor hPSE is translated only in normal prostate epithelial cells. *Cancer Res* **60**, 1348–1352.
- [18] Turner DP, Moussa O, Sauane M, Fisher PB, and Watson DK (2007). Prostate-derived Ets factor is a mediator of metastatic potential through the inhibition of migration and invasion in breast cancer. *Cancer Res* **67**, 1618–1625.
- [19] Gu X, Zerbin LF, Otu HH, Bhasin M, Yang Q, Joseph MG, Grall F, Onatunde T, Correa RG, and Libermann TA (2007). Reduced PDEF expression increases invasion and expression of mesenchymal genes in prostate cancer cells. *Cancer Res* **67**, 4219–4226.
- [20] Ghadersohi A, Pan D, Fayazi Z, Hicks DG, Winston JS, and Li F (2007). Prostate-derived Ets transcription factor (PDEF) downregulates survivin expression and inhibits breast cancer cell growth *in vitro* and xenograft tumor formation *in vivo*. *Breast Cancer Res Treat* **102**, 19–30 (Epub 2006 Aug 8).
- [21] Lepage S and Lapointe R (2006). Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II–restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res* **66**, 2423–2432.
- [22] Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**, e45.
- [23] Pfaffl MW, Horgan GW, and Dempfle L (2002). Relative Expression Software Tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36.
- [24] Forget MA, Turcotte S, Beauseigle D, Godin-Ethier J, Pelletier S, Martin J, Tanguay S, and Lapointe R (2007). The Wnt pathway regulator DKK1 is preferentially expressed in hormone-resistant breast tumours and in some common cancer types. *Br J Cancer* **96**, 646–653.
- [25] Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, et al. (2007). Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* **67**, 2517–2525.
- [26] Abdul-Rasool S, Kidson SH, Panieri E, Dent D, Pillay K, and Hanekom GS (2006). An evaluation of molecular markers for improved detection of breast cancer metastases in sentinel nodes. *J Clin Pathol* **59**, 289–297.
- [27] Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, et al. (2006). Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* **8**, R23 (Epub 2006 Apr 20).

ANNEXE II. Manuscrit

Endogenously-expressed influenza A M1 and NP proteins are efficiently presented by class-I and-II major histocompatibility complexes

Running title: Endogenous influenza proteins are efficiently presented

Jean-Daniel Doucet^a, Marie-Andrée Forget^a, Cécile Grange^a, Ronan Nicolas Rouxel^b, Nathalie Arbour^a, Veronika von Messling^b and Réjean Lapointe^{a*}.

^a Research Centre, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM)-Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal and Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada;

^b INRS-Institut Armand-Frappier, University of Quebec, Laval, Canada

Manuscrit soumis à *Journal of General Virology*

Summary

Current influenza vaccines containing primarily hyper-variable hemagglutinin and neuraminidase proteins must be prepared against new strains. Therefore, there is an ongoing effort to develop influenza vaccines that also elicit strong and sustained cytotoxic responses against highly-conserved determinants such as the matrix (M1) protein and nucleoprotein (NP). However, their antigenic presentation properties in humans are less defined. Accordingly, we analyzed MHC-I and -II presentation of endogenously-processed M1 and NP in human antigen presenting cells and observed expansion of both CD8⁺ and CD4⁺ specific effector T lymphocytes secreting interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF). Further enhancement of basal MHC-II antigenic presentation did not improve CD4⁺ or CD8⁺ T cell quality based on cytokine production upon challenge, suggesting that endogenous M1 and NP MHC-II presentation is sufficient. These new insights about T lymphocyte expansion following endogenous M1 and NP MHC-I and -II presentation will be important to design complementary heterosubtypic vaccination strategies.

Introduction

Current trivalent inactivated influenza vaccines (TIV) mainly induce a humoral response against hypervariable hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) surface antigens. Hence, production of new vaccines is required for every new influenza strains. Considering the ongoing threat of an influenza pandemic (WHO, 2009), vaccines targeting better conserved antigens are required. The influenza A matrix protein (M1) and nucleoprotein (NP) share more than 90 % amino acid sequence identity even between distant influenza A subtypes (Heiny et al., 2007), and Supplementary Table I). Moreover, many human M1 and NP T cell epitopes are essential for the virus' fitness (Berkhoff et al., 2006) and are thus well-conserved (Bui et al., 2007; Lee et al., 2008). In contrast, HA and NA vary in up to 40 % their amino acid sequences. These differences are mainly seen in the extracellular globular head of the HA glycoprotein, which contains the receptor binding site (Schweiger et al., 2002) whose inhibition is critical to prevent cell-entry of the virus. Hence, HA glycoprotein is less likely to induce heterosubtypic cross-reactive immunity.

Viral proteins must be processed by infected cells or antigen presenting cells (APCs) to elicit a cellular immune response. Although such a response does not confer sterile immunity to influenza, it has been shown to mediate influenza virus clearance in animal models (Thomas et al., 2006) and in humans (McMichael et al., 1983). In animal models, a cellular immune response has long been associated with heterosubtypic protection against various influenza A strains (Furuya *et al.*, 2010; Taylor & Askonas, 1986), including H5N1 (Epstein et al., 2002; Price et al., 2009; Zhirnov et al., 2007) and the 2009 pandemic H1N1 (Skountzou et al., 2010). It has also been established that M1 and NP (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008) are the main targets of the human immune cellular response against influenza, similarly to HA and NA for the humoral immune response. Hence, recent reports strongly suggest that M1 and NP could be very relevant targets for an influenza pan-specific vaccine.

A wide range of conserved major histocompatibility complexes of class (MHC) -I and -II influenza A NP- and M1-specific epitopes has been characterized (Jameson *et al.*, 1999; Kreijtz *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008). However, little is known about how influenza protein processing in human APCs stimulates expansion of T lymphocytes, particularly

when these proteins are endogenously-expressed, which would most likely be the case in T cell-stimulating vaccines. Most studies on epitope identification with influenza-specific human T cells have exploited peptide libraries covering the influenza genome (Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008), exogenously loaded proteins (Gschoesser et al., 2002), or influenza infected cells (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008). In the latter 2 cases, some of the processed proteins could originate from an exogenous source potentially involving the endosomal pathway, while use of peptide libraries excludes endogenous processing pathways. In contrast, vaccines inducing M1- and NP-specific T cell expansion, such as the live-attenuated virus vaccines (LAIV) most likely involve endogenous expression of these proteins. Endogenously-expressed M1 is known to be presented by MHC-I and cross-presented by MHC-II in human APCs (Jaraquemada et al., 1990; Nuchtern et al., 1990). However, the magnitude and importance of MHC-II cross-presentation of endogenous M1 is unclear (Schmid et al., 2007), and no information is available regarding NP MHC-II cross-presentation. It is also unclear whether MHC-II cross-presentation can stimulate a robust *in vitro* expansion of specific T lymphocytes.

Here, we sought to characterize the MHC-I and -II presentation of endogenous influenza M1 and NP antigens in a T-cell-inducing vaccine-like context for the first time. We performed *in vitro* T cell sensitization assays, by stimulating normal donor (ND) PBMCs with autologous APCs expressing endogenous M1 or NP antigens from a DNA plasmid and by characterizing the ensuing CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte response. Considering the capacity of endogenously-expressed M1 to be presented by MHC-II, we questioned whether NP shared similar properties. Finally, we investigated whether the level of MHC-II cross-presentation was sufficient for M1 and NP CD4⁺ T cell expansion, which plays a key role in cellular immune responses.

Results

Efficient presentation of MHC-I and -II epitopes derived from M1 and NP to human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes

Initially, we evaluated whether endogenous wild type (WT) influenza M1 and NP protein are efficiently presented by human MHC-I and -II. We electroporated CD40-activated B lymphocytes (CD40-B cells) with M1- and NP-encoding plasmids (Figure 1a) and co-cultured them with previously generated autologous M1- or NP-specific CD8⁺ or CD4⁺ T cell clones. CD40-B cells are valuable model APCs because they can be expanded from a limited quantity of PBMCs, while possessing antigen presenting characteristics comparable to dendritic cells (DC) (Lapointe et al., 2003; Schultze et al., 1997). In these cells, endogenously-expressed M1 and NP proteins were both recognized by CD8⁺ (Figure 1c, black bars) and by CD4⁺ T cell clones (Figure 1d, black bars). To our knowledge, this represents the first report of NP MHC-II cross-presentation. Observed M1 MHC-II cross-presentation is in agreement with previous work (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990).

We next questioned whether this MHC-II presentation to CD4⁺ T cells could be enhanced to favor a better cellular immune response. We fused the M1 and NP genes with previously characterized gp100 MHC-II mobilization sequences (Figure 1b; referred to as gp-M1 and gp-NP). These sequences enhance the MHC-II presentation of endogenous proteins by targeting them to endosomal compartments without disrupting presentation of MHC-I epitopes (Lepage & Lapointe, 2006).

To compare M1 and NP expression levels with or without gp100 MHC-II enhancing sequences in human cells, their expression in HEK-293T cells was assessed by Western blotting (M1) and intracellular staining (NP). Both M1 (27.9 kDa) and gp-M1 (39.9 kDa) were produced at comparable levels (Figure 1e). The faster-migrating band in the gp-M1 lane represents the gp-M1 fusion protein after gp100 signal peptide (SS) cleavage. The proportions of NP- and gp-NP-transfected cells were also similar for both proteins, as were their expression level as determined by the mean fluorescence intensity (MFI) determined by flow cytometry (Figure 1f). Thus, both WT (M1 or NP) and MHC-II-enhanced (gp-M1 or gp-NP) proteins were produced at similar levels. Accordingly, M1 and gp-M1 were equally recognized by a CD8⁺ T cell clone specific to the well-characterized and conserved

HLA-A2 restricted M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope (Bednarek et al., 1991; Touvrey et al., 2009) (data not shown). Overall, gp100 MHC-II mobilization sequences did not seem to affect M1 or NP expression levels.

Consistent with the previously-reported enhancement of MHC-II presentation associated with the gp100 sequences (Lepage & Lapointe, 2006), gp-M1 and gp-NP resulted in higher interferon-gamma (IFN- γ) secretion by CD4⁺ T cell clones compared to their WT counterparts (Figure 1d, grey bars), while MHC-I presentation to CD8⁺ T cells was slightly down-modulated (Figure 1c, grey bars). It was unclear, however, if enhanced MHC-II presentation improved CD4⁺ and CD8⁺ T cell expansion.

Expansion of human T lymphocytes by in vitro T cell sensitization with endogenously-expressed M1 and NP

To evaluate if enhanced MHC-II presentation improved CD4⁺ and CD8⁺ T cell expansion, we next stimulated PBMCs with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP plasmids. Bulk T cell cultures were re-stimulated according to the same procedure on day 7. T cells were tested for specificity to their relevant antigens on day 21 of the expansion protocol, 14 days after antigen stimulation to obtain sufficient cell counts.

Recognition assays from T cell expansions were performed with 3 representative HLA-A2⁺ normal donors. All donors developed M1- and NP-specific T cell lines when stimulated with M1 and NP, with or without enhancement of MHC-II presentation, as determined by IFN- γ secretion (Figure 2a and b). Addition of antibodies blocking MHC-I and -II presentation of APCs revealed that most of M1 and NP T cell lines were composed of CD8⁺ T cells as IFN- γ secretion was inhibited by MHC-I specific antibodies (black arrows). A similar IFN- γ response by CD8⁺ T cells was observed in 3 additional normal donors (Supplementary Figure 1a, c and d). Among these T cell lines, at least one responded to the defined M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope (Supplementary Figure 1d), which is consistent with reports of the M1⁵⁸⁻⁶⁶ epitope being an important part of a relatively broad influenza T cell epitope response in HLA-A2⁺ normal donors (Boon et al., 2002).

Furthermore, M1 and NP stimulations of bulk T cells resulted in the generation of CD4⁺ T cells secreting significant amounts of IFN- γ , since MHC-II blocking antibodies

interfered with IFN- γ secretion by M1- (ND#2, 3), NP- (ND#3) and gp-NP- (ND#2) grown T cell lines (Figure 2a and b, white arrows). Similar results were also obtained with gp-M1 expanded T cell lines with 2 other normal donors (Supplementary Figure 1b and c). Moreover, a single cell line may contain a heterogeneous population of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes thereby explaining effect of both MHC-I and -II-blocking antibodies on certain cell lines (M1-grown, ND#2, 3). However, expansion of CD4⁺ T cells was independent of the presence of the MHC-II enhancing sequences. The efficacy of the MHC-blocking antibodies was controlled by the blockade or strong inhibition of IFN- γ secretion by previously-isolated CD8⁺ or CD4⁺ T cell clones (Figure 2c-d).

Together, these results indicate that both CD8⁺ and CD4⁺ T cells can be simultaneously expanded by exposure to endogenous M1 and NP in an *in vitro* T cell sensitization assay, with or without enhancement of MHC-II presentation, based on IFN- γ secretion from the bulk T cell population. However, in addition to IFN- γ , other Th1 cytokines are required for optimal antiviral activity. Indeed, multi-cytokine secretion is intimately linked to robust immune cellular responses.

Effector cytokine secretion of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell

Accordingly, we investigated the quality of M1 and NP CD8⁺ T cells generated by *in vitro* T cell sensitization at the single cell level. More specifically, we evaluated whether the intrinsic endogenous MHC-II presentation of M1 and NP antigens was sufficient for the generation of CD4⁺ T cell-mediated help that could improve the quality of expanded CD8⁺ T cells. We, therefore, analyzed multi-cytokine expression (IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF) and interleukin (IL)-2) by M1- and NP-specific T cells after stimulation with their cognate antigen using intracellular cytokine staining (ICS). An example of the gating strategy is shown in Supplementary Figure 2. While no IL-2 expression was detected in any of the CD8⁺ T cell lines tested (data not shown), 0.5-4 % of T cells from each line produced both TNF and IFN- γ (Figure 3a-c). Up to 6 % of T cells were single IFN- γ producers, and up to 3 % produced TNF only (Figure 3a-c). Furthermore, CD8⁺ T cell clones expanded with either gp-M1- or NP-expressing APCs presented the degranulation marker CD107a on their cellular surface after antigen-specific stimulation (Supplementary Figure 3a). MIP-1 β , an important chemokine for the recruitment of memory T cells and other immune cell

types, was also detected in most M1- and NP-specific T cell lines (Supplementary Figure 3b).

Consistent with IFN- γ quantification (Figure 2), MHC-II-enhanced presentation of M1 and NP did not result in increased CD4⁺ T cell responders (Figure 4). Comparable proportions of TNF⁺ or TNF⁺/IFN- γ ⁺ CD4⁺ T cells were obtained in M1- and NP-specific T cell lines expanded with either MHC-II-enhanced or WT sequences. In contrast to CD8⁺ T cells, low IL-2 levels were occasionally detected in CD4⁺ T cells (Figure 4b).

Overall, our results indicate that, in the context of *in vitro* T-cell sensitization, the intrinsic MHC-II presentation of endogenously-expressed M1 and NP antigens is sufficient for Th1 cytokine secretion of specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The secretion of Th1 cytokines further suggests an effector phenotype of the expanded M1- and NP-specific T lymphocytes.

Phenotype of M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells

To pursue phenotypic characterization of IFN- γ -secreting M1- and NP-specific T cells, surface marker profile was analyzed. Most cells lacked the naive marker CD45RA, the secondary lymphoid tissue ‘‘homing’’ receptor CD62L (Figure 5), and the IL-7 receptor (CD127) (Supplementary Figure 4), consistent with an effector T cell phenotype. Again, there were no major differences between the phenotype of CD8⁺ T cells from either MHC-II-enhanced or WT M1- and NP-grown T cell lines (Figure 5a), and a similar phenotype was observed in CD4⁺ T cells (Figure 5b).

Discussion

A robust cellular immune response against conserved influenza M1 and NP could provide heterosubtypic immunity to influenza. Current TIVs do not induce a good cellular immune response. However, available modified LAIV (Mueller et al., 2010) or DNA vaccines in development (Kim & Jacob, 2009; Moss, 2009) are expected to trigger strong humoral and cellular immune responses. These influenza vaccines will most likely involve endogenous expression of antigens in APCs. Hence, this study focused on the characterization of MHC-I and -II presentation of endogenously-expressed M1 and NP conserved influenza proteins by model APCs which expanded both CD8⁺ and CD4⁺ specific T lymphocytes from human PBMCs in *in vitro* T cell sensitization assays. Furthermore, although MHC-II presentation was increased by the addition of gp100 MHC-II mobilization sequences, the quality of expanded M1- and NP-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells was comparable between MHC-II-enhanced or WT proteins expressed by APCs.

In line with previous reports that identified a variety of MHC-I and -II T cell epitopes in M1 and NP recognized by most individual's PBMCs (Gschoesser et al., 2002; Jameson et al., 1999; Kreijtz et al., 2008; Lee et al., 2008), we expanded both M1- and NP-specific T lymphocytes from PBMCs of different HLA-A2⁺ normal donors. We have also identified some MHC epitopes recognized by these T cells (Doucet *et al.*, 2010). However, many of the previous studies on influenza antigen presentation have focused on clonal T cell populations that may have been altered during isolation. In contrast, we speculate that T cell lines expanded in the current study more closely mimic *in vivo* polyclonal expansion. Accordingly, we obtained around 5-6 % of specific T lymphocytes, which is consistent with the proportion of antigen-specific T cell expanded *in vivo*.

Furthermore, both CD8⁺ and CD4⁺ M1- and NP-specific T cells were expanded. Classically, the MHC-II presentation of endogenously-processed proteins to CD4⁺ T cells is considered limited and restricted to exogenous proteins (Rush et al., 2002; Van den Bosch et al., 2006; Voo et al., 2002). MHC-I and-II Influenza antigenic cross-presentation has, however, been reported. Soluble NP can be cross-presented by MHC-I in PBMCs (Gschoesser et al., 2002), whereas endogenous WT M1 can be cross-presented by MHC-II (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990). Thus, we report similar NP MHC-II antigenic cross-presentation for the first time. It is also possible that M1 and NP got

endocytosed from dying-electroporated APCs as a secondary classical MHC-II presentation mechanism. Nonetheless, there is MHC-II presentation to previously expanded CD4⁺ T cells (Figure 1f). In this case, the short period of time between APCs electroporation and their co-culture with the CD4⁺ T cells doubtfully allows for dead APCs to be taken up by other APCs for classical MHC-II antigenic processing.

Hence, the precise mechanism of endogenous M1 and NP MHC-II cross-presentation is unclear. In the case of M1, it does not involve the classical endosomal secretory pathway (Jaraquemada *et al.*, 1990; Nuchtern *et al.*, 1990), the proteasome, nor the transporter associated with antigen processing (TAP), but does instead depend on lysosomal proteases (Guéguen & Long, 1996). Considering the nuclear (NP and M1) and cytoplasmic (M1) localization of these proteins, autophagy, involved in influenza A replication, could be a plausible MHC-II cross-presentation mechanism (Schmid *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2009).

MHC-II antigenic cross-presentation of influenza antigens is of particular interest since the anti-influenza CD4⁺ helper T cells are crucial for specific cellular immune responses (Janssen *et al.*, 2003; Maecker *et al.*, 1998; Swain *et al.*, 2006). Our *in vitro* experimental setting did not allow long-term T cell culture and therefore prevented the evaluation of the role of CD4⁺ T cells in long-term CD8⁺ memory T cell expansion. Nevertheless, expanded CD4⁺ T cells could directly participate in the peripheral anti-influenza immune response by secreting inflammatory cytokines/chemokines (Nakanishi *et al.*, 2009; Swain *et al.*, 2006).

Moreover, MHC-II presentation level of endogenous M1 and NP could be enhanced by MHC-II-enhancing sequences as performed before with autophagosome-associated protein Atg8/LC3 MHC-II-enhancing sequences (Gschoesser *et al.*, 2002). However, in our setting, MHC-II-enhancing did not reflect on the number of cytokine secretors (IFN- γ , TNF and IL-2, Figure 4), or on a change in CD4⁺ or CD8⁺ T cell phenotype (Figure 5).

Multifunctionality is a hallmark of an efficient anti-viral T cell response (Akondy *et al.*, 2009; De Rosa *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2008; Seder *et al.*, 2008) and is less characterized in human influenza-specific T cells (Lee *et al.*, 2008; Touvrey *et al.*, 2009), particularly after stimulation with multiple potential epitopes. In all donors, TNF and/or IFN- γ secreting M1- and NP-specific CD8⁺ T lymphocytes were detected, indicating the

presence of Tc1 influenza-specific effector CD8⁺ T cells implicated in influenza virus clearance and protection (Baumgarth & Kelso, 1996; Deng *et al.*, 2004; Hikono *et al.*, 2006).

Furthermore, M1- and NP-specific T cell lines secreted MIP-1 β . C-C chemokine receptor 5 (CCR5), MIP-1 β 's receptor, is transiently upregulated on CD8⁺ memory T cells after influenza infection and has been shown to be crucial for virus control in mice (Kohlmeier *et al.*, 2008). M1- and NP-specific T cells also degranulated upon antigen-specific stimulation, suggesting potential cytotoxic activity that is also critical in influenza virus clearance, although the presence of lytic enzymes was not assessed.

Altogether, our data suggest sufficient MHC-I and -II presentation of M1 and NP proteins for multifunctional effector T cell expansion, at least upon short term stimulation. Notably, NP-specific mouse CD8⁺ T cells also present an effector phenotype 10 days following NP DNA vaccine immunization or influenza infection (Supplementary Figure 5).

We also observed a comparable effector phenotype of M1- and NP-specific T cells expanded with or without MHC-II enhanced presentation, as determined by CD45RA and CD62L expression. However, in contrast to other studies carried out on influenza M1⁵⁸⁻⁶⁶-specific T cells (Touvrey *et al.*, 2009), we did not detect CD127, a marker present on both naive and memory T cells, on M1- and NP-specific effector (CD45RA/CD62L⁺) T cells. The lack of this marker may be explained by the early stage of effector T cells which did not yet re-express detectable levels of CD127 or by subtypes of memory T cell not expressing CD127 (Bachmann *et al.*, 2005; Boettler *et al.*, 2006; Touvrey *et al.*, 2009). We also used IL-2 to expand T cells to sufficient numbers for our experiments, which could have favored an effector phenotype.

Taken together, our results demonstrate that endogenously-expressed influenza M1 and NP are sufficiently well presented by MHC-I and -II for *in vitro* short-term CD8⁺ and CD4⁺ T cell activation. The mechanism by which influenza M1 and NP are cross-presented by MHC-II remains to be defined but could involve autophagy, among other alternative MHC cross-presenting pathways identified recently. Thus, the diversity of antigen presentation mechanisms appears to depend on the pathogen studied and could, therefore, contribute to reconfiguration and improvement of influenza vaccine strategies.

Materials and methods

Peripheral blood mononuclear cells

PBMCs obtained from healthy individuals after informed consent were separated from heparinized donor blood as described previously (Pelletier et al., 2009). PBMCs were cryopreserved in 90 % FBS (Wisent) /10 % DMSO (Sigma), and stored in liquid nitrogen.

Generation of CD40-activated B lymphocytes (CD40-B cells)

CD40-B cells were generated as described previously (Lapointe et al., 2003). Briefly, recombinant soluble CD40L ($1,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Immunex Corporation) and recombinant human IL-4 ($250 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$; Peprotech) were added to PBMCs on the first day which were then cultured in complete medium, consisting of Iscove's modified Dulbecco's complete medium (Invitrogen) supplemented with 7.5 % human AB serum (heat-inactivated, Gemini Bio-products), 2 mM L-glutamine, $100 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ penicillin, $100 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ streptomycin, and $10 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ gentamicin (Wisent). Fresh complete medium containing $250 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ IL-4 and $1,000 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ CD40L was added on day 3. After the first round of proliferation (days 5-8), cells were either frozen for future use or re-stimulated every 2-3 days when the culture reached a density of $1.5\text{-}2 \times 10^6 \text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$, about 40 to 90 % of proliferating cells being $\text{CD}19^+ \text{HLA-DR}^+$ B lymphocytes.

Plasmids

NP and M1 from the influenza virus A/Puerto Rico/8/1934/H1N1 (PR8) strain (uniprot # P03466 (NP) and # P03485 (M1)), from which the first methionine was deleted, were cloned between the putative NH2-terminal signal sequence (first 23 residues) and the last 84 residues from gp100, which includes previously-characterized MHC-II compartment mobilization sequences (Lepage & Lapointe, 2006). The resulting constructs, named gp-NP, gp-M1 and WT NP and M1 cDNA sequences, were optimized with GeneOptimizer[®] from Geneart and cloned in pcDNA3.1(+) plasmid (Invitrogen). The plasmids were transformed into *E. coli* one shot top 10 competent cells[®] (Invitrogen) and prepared with Mega-Prep kit (Qiagen).

Cell lines

HEK-293T cells, obtained from ATCC, were cultured in RPMI 1640 (Wisent) supplemented with 10 % heat-inactivated FBS (Wisent), 2 mmol·L⁻¹ L-glutamine, 100 units·mL⁻¹ penicillin/streptomycin, and 10 µg·mL⁻¹ gentamicin (R-10). Cells were cryopreserved in 90 % R-10 /10 % DMSO, and stored in liquid nitrogen.

Western blotting

HEK-293T cells were transfected with M1 or gp-M1 plasmids using lipofectaminetm and Plustm reagents (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 24 h, protein extracts from pelleted cells were prepared, quantified and resolved by 10 % SDS-PAGE, as performed previously (Turcotte et al., 2007). An anti-M1 mouse monoclonal antibody (1/200; clone GA2B, AbD Serotec) and a secondary peroxidase- conjugated goat anti-mouse antibody (1/10,000; Chemicon) were employed for Western blotting revelation.

Electroporation of APCs

APCs were electroporated with a MP-100 microporator (Digital-bio) following procedures according to the manufacturer. Briefly, CD40-B cells (1-2x10⁶) were sedimented for 15 min at 700 r.p.m., resuspended in 200 µl of resuspension buffer (Digital-bio) and mixed with 3 µg·10⁻⁶ cells of DNA. The cells were immediately electroporated with 1 pulse at 1,700 V for 20 ms and resuspended at 1X10⁶ cells·mL⁻¹ of Iscove's modified Dulbecco's complete medium containing 10 % FBS and 2 mM L-glutamine (all from Wisent), without antibiotics.

Expansion of M1- or NP-specific peripheral T lymphocytes and cloning of antigen-specific bulk T cell cultures

PBMCs were stimulated with autologous CD40-B cells electroporated with the M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio. On day 7, bulk T cells were restimulated according to the same procedure, and 150-300 IU·mL⁻¹ of IL-2 (Feldan Bio) were added to the cultures on the following day and every 2–3 days. T cell specificity was assessed on day 21 on the basis of cytokine secretion by ELISA or by intracellular cytokine assay. T cell lines or clones (5x10⁴) were co-cultured with CD40-B cells (5x10⁴) electroporated with DNA or pulsed with peptides. IFN-γ secretion was measured by ELISA as previously

described (Pelletier et al., 2009). In some recognition assays, CD40-B cells were pre-pulsed for 20 min at 37°C under 5 % CO₂ with 40-80 µg·mL⁻¹ of blocking antibodies specific for either MHC-I (clone W6/32) or MHC-II (clone IV A12).

M1- or NP-specific bulk T cells expanded as mentioned earlier were cloned by limiting dilution and cultured as previously described (Lapointe et al., 2003). T cell clone phenotypes were analyzed by flow cytometry, and their specificities were evaluated as before by co-culture with M1- or NP- electroporated CD40-B cells on the basis of their IFN-γ secretion.

Recognition assays

IFN-γ ELISA were performed as before (Pelletier et al., 2009), while MIP-1β ELISA were performed with the CCL4/ MIP-1β DuoSet® kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions.

For ICS, T cell lines were co-cultured with autologous CD40-B cells electroporated with M1, gp-M1, NP or gp-NP DNA plasmids in a 2:1 ratio for 1 h and for an additional 6h in the presence of brefeldin A (5 µg·mL⁻¹; Sigma). The cells were stained with Alexa-700, Pacific Blue and Allophycocyanin (APCy) -H7-conjugated antibodies specific to human CD3, CD4, and CD8 respectively (all from BD Biosciences). For T cell phenotype analysis, the cells were also stained with APCy, PE and FITC-conjugated antibodies specific for human CD62L, CD127 and CD45RA or corresponding isotype controls (all from BD Biosciences). Dead cells were excluded by staining with the live/dead fixable dead cell stain Kits (Invitrogen) when indicated. The cells were surface stained, fixed and permeabilized with FoxP3 staining buffer set (eBioscience) according to the manufacturer's instructions. Intracellular staining was performed with antibodies against IFN-γ (eBioscience), TNF, IL-2 (the latter 2 from BD Biosciences) or corresponding isotype controls. Flow cytometry data was acquired using LSRII instrument (BD Bioscience), and analyzed by FlowJo software (Tree Star) with a Boolean gating strategy.

For intracellular detection of NP, HEK-293T cells were transfected as before, with NP or gp-NP with a fluorescein-conjugated antibody against influenza A NP (Argene, cat #12-030).

Acknowledgements

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; Grant # PAN-83153). R.L. and J.-D.D. are recipients of scholarships from Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ). N.A. holds a Donald Paty Career Development Award from the Multiple Sclerosis Society of Canada and a Chercheur-Boursier from the FRSQ. The authors thank Jessica Godin-Ethier and Mélissa Mathieu for helpful discussions, Alexandre Reuben for careful reading of this manuscript and Ovid Silva and the CRCHUM Research Support Office (Bureau d'aide à la recherche) for manuscript editing.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

References

- Akondy, R. S., Monson, N. D., Miller, J. D., Edupuganti, S., Teuwen, D., Wu, H., Quyyumi, F., Garg, S., Altman, J. D. & other authors (2009). The yellow fever virus vaccine induces a broad and polyfunctional human memory CD8⁺ T cell response. *J Immunol* **183**, 7919-7930.
- Bachmann, M. F., Wolint, P., Schwarz, K., Jäger, P. & Oxenius, A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8⁺ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor α and CD62L. *J Immunol* **175**, 4686-4696.
- Baumgarth, N. & Kelso, A. (1996). *In vivo* blockade of gamma interferon affects the influenza virus-induced humoral and the local cellular immune response in lung tissue. *J Virol* **70**, 4411-4418.
- Bednarek, M. A., Sauma, S. Y., Gammon, M. C., Porter, G., Tamhankar, S., Williamson, A. R. & Zweerink, H. J. (1991). The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol* **147**, 4047-4053.
- Berkhoff, E. G. M., de Wit, E., Geelhoed-Mieras, M. M., Boon, A. C. M., Symons, J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2006). Fitness costs limit escape from cytotoxic T lymphocytes by influenza A viruses. *Vaccine* **24**, 6594-6596.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H. C., Blum, H. E. & Thimme, R. (2006). Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8⁺ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* **80**, 3532-3540.
- Boon, A. C. M., de Mutsert, G., Graus, Y. M. F., Fouchier, R. A. M., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A. D. M. E. & Rimmelzwaan, G. F. (2002). The magnitude and specificity of influenza A virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in humans is related to HLA-A and -B phenotype. *J Virol* **76**, 582-590.
- Bui, H.-H., Peters, B., Assarsson, E., Mbawuike, I. & Sette, A. (2007). Ab and T cell epitopes of influenza A virus, knowledge and opportunities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 246-251.
- De Rosa, S. C., Lu, F. X., Yu, J., Perfetto, S. P., Falloon, J., Moser, S., Evans, T. G., Koup, R., Miller, C. J. & other authors (2004). Vaccination in humans generate broad T cell cytokine responses. *J Immunol* **173**, 5372-5380.
- Deng, Y., Jing, Y., Campbell, A. E. & Gravenstein, S. (2004). Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly. *J Immunol* **172**, 3437-3446.

- Doucet, J.-D., Gauchat, D. & Lapointe, R. (2010). Brief Communication: Identification of T cell epitopes by a novel mRNA PCR-based epitope chase technique. *J Immunother*, in press.
- Epstein, S. L., Tumpey, T. M., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Cooper, L. A., Subbarao, K., Renshaw, M., Sambhara, S. & Katz, J. M. (2002). DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg Infect Dis* **8**, 796-801.
- Furuya, Y., Chan, J., Regner, M., Lobigs, M., Koskinen, A., Kok, T., Manavis, J., Li, P., Müllbacher, A. & other authors (2010). Cytotoxic T cells are the predominant players providing cross-protective immunity induced by gamma-irradiated influenza A viruses. *J Virol* **84**, 4212-4221.
- Gschoesser, C., Almanzar, G., Hainz, U., Ortin, J., Schonitzer, D., Schild, H., Saurwein-Teissl, M. & Grubeck-Loebenstien, B. (2002). CD4⁺ and CD8⁺ mediated cellular immune response to recombinant influenza nucleoprotein. *Vaccine* **20**, 3731-3738.
- Guéguen, M. & Long, E. O. (1996). Presentation of a cytosolic antigen by major histocompatibility complex class II molecules requires a long-lived form of the antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 14692-14697.
- Heiny, a. T., Miotto, O., Srinivasan, K. N., Khan, A. M., Zhang, G. L., Brusica, V., Tan, T. W. & August, J. T. (2007). Evolutionarily conserved protein sequences of influenza A viruses, avian and human, as vaccine targets. *PLoS One* **2**, e1190.
- Hikono, H., Kohlmeier, J. E., Ely, K. H., Scott, I., Roberts, A. D., Blackman, M. A. & Woodland, D. L. (2006). T-cell memory and recall responses to respiratory virus infections. *Immunol Rev* **211**, 119-132.
- Jameson, J., Cruz, J., Terajima, M. & Ennis, F. A. (1999). Human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species. *J Immunol* **162**, 7578-7583.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. & Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856.
- Jaraquemada, D., Marti, M. & Long, E. O. (1990). An endogenous processing pathway in vaccinia virus-infected cells for presentation of cytoplasmic antigens to class II-restricted T cells. *J Exp Med* **172**, 947-954.
- Kim, J. H. & Jacob, J. (2009). DNA vaccines against influenza viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**, 197-210.
- Kohlmeier, J. E., Miller, S. C., Smith, J., Lu, B., Gerard, C., Cookenham, T., Roberts, A. D. & Woodland, D. L. (2008). The chemokine receptor CCR5 plays a key role in the early memory CD8⁺ T cell response to respiratory virus infections. *Immunity* **29**, 101-113.

- Kreijtz, J. H., Mutsert, G. D., Baalen, C. A. V., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D. & Rimmelzwaan, G. F. (2008). Cross-recognition of avian H5N1 influenza virus by human cytotoxic T lymphocyte populations directed to human influenza A virus. *J Virol* **82**, 5161-5166.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J. & Hwu, P. (2003). CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* **63**, 2836-2843.
- Lee, L. Y.-h., Lien, D., Ha, A., Simmons, C., Jong, M. D. D., Chau, N. V. V., Schumacher, R., Peng, Y. C., McMichael, A. J. & other authors (2008). Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J Clin Invest* **118**, 3478-3490.
- Lepage, S. & Lapointe, R. (2006). Melanosomal targeting sequences from gp100 are essential for MHC class II-restricted endogenous epitope presentation and mobilization to endosomal compartments. *Cancer Res* **66**, 2423-2432.
- Maecker, H. T., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Levy, S. (1998). Cytotoxic T cell responses to DNA vaccination: dependence on antigen presentation via Class II MHC. *J Immunol* **161**, 6532-6536.
- McMichael, A., Gotch, F., Noble, G. & Beare, P. (1983). Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N Engl J Med* **309**, 13-17.
- Miller, J. D., van der Most, R. G., Akondy, R. S., Glidewell, J. T., Albott, S., Masopust, D., Murali-Krishna, K., Mahar, P. L., Edupuganti, S. & other authors (2008). Human effector and memory CD8⁺ T cell responses to smallpox and yellow fever vaccines. *Immunity* **28**, 710-722.
- Moss, R. B. (2009). Prospects for control of emerging infectious diseases with plasmid DNA vaccines. In *J Immune Based Ther Vaccines*. URL: <http://www.jibtherapies.com/content/7/1/3>, accessed December 14th 2010.
- Mueller, S. N., Langley, W. A., Carnero, E., Garcia-Sastre, A. & Ahmed, R. (2010). Immunization with live attenuated influenza viruses that express altered NS1 proteins results in potent and protective memory CD8⁺ T-cell responses. *J Virol* **84**, 1847-1855.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C. & Iwasaki, A. (2009). CD8⁺ T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4⁺ T-cell help. *Nature* **462**, 510-513.
- Nuchtern, J. G., Biddison, W. E. & Klausner, R. D. (1990). Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* **343**, 74-76.

- Pelletier, S., Tanguay, S., Lee, S., Gunaratnam, L., Arbour, N. & Lapointe, R. (2009). TGF- α as a candidate tumor antigen for renal cell carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1207-1218.
- Price, G. E., Soboleski, M. R., Lo, C.-Y., Misplon, J. A., Pappas, C., Houser, K. V., Tumpey, T. M. & Epstein, S. L. (2009). Vaccination focusing immunity on conserved antigens protects mice and ferrets against virulent H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *Vaccine* **27**, 6512-6521.
- Rush, C., Mitchell, T. & Garside, P. (2002). Relevant antigen to appropriate sufficient levels of immunologically on appropriate targeting of T cells by DNA vaccination depends efficient priming of CD4⁺ and CD8⁺ processing pathways. *J Immunol* **169**, 4951-4960.
- Schmid, D., Pypaert, M. & Münz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* **26**, 79-92.
- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G. & Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **100**, 2757-2765.
- Schweiger, B., Zadow, I. & Heckler, R. (2002). Antigenic drift and variability of influenza viruses. *Med Microbiol Immunol* **191**, 133-138.
- Seder, R. A., Darrah, P. A. & Roederer, M. (2008). T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* **8**, 247-258.
- Skountzou, I., Koutsouanos, D. G., Kim, J. H., Powers, R., Satyabhama, L., Maseoud, F., Weldon, W. C., Martin, M. d. P., Mittler, R. S. & other authors (2010). Immunity to pre-1950 H1N1 influenza viruses confers cross-protection against the pandemic swine-origin 2009 A (H1N1) influenza virus. *J Immunol* **185**, 1642-1649.
- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., Jones, S. C., Kamperschroer, C., Lee, W.-H. & other authors (2006). CD4⁺ T-cell memory: generation and multi-faceted roles for CD4⁺ T cells in protective immunity to influenza. *Immunol Rev* **211**, 8-22.
- Taylor, P. M. & Askonas, B. A. (1986). Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* **58**, 417-420.
- Thomas, P. G., Keating, R., Hulse-Post, D. J. & Doherty, P. C. (2006). Cell-mediated protection in influenza infection. *Emerg Infect Dis* **12**, 48-54.
- Touvrey, C., Derré, L., Devedre, E., Cortes, P., Romero, P., Rufer, N. & Speiser, D. E. (2009). Dominant human CD8 T cell clonotypes persist simultaneously as memory and effector cells in memory phase. *J Immunol* **182**, 6718-6726.

Turcotte, S., Forget, M.-A., Beauseigle, D., Nassif, E. & Lapointe, R. (2007). Prostate-derived Ets transcription factor overexpression is associated with nodal metastasis and hormone receptor positivity in invasive breast cancer. *Neoplasia* **9**, 788-796.

Van den Bosch, G. a., Van Gulck, E., Ponsaerts, P., Nijs, G., Lenjou, M., Apers, L., Kint, I., Heyndrickx, L., Vanham, G. & other authors (2006). Simultaneous activation of viral antigen-specific memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cells using mRNA-electroporated CD40-activated autologous B-cells. *J Immunother* **29**, 512-523.

Voo, K. S., Fu, T., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Rooney, C. M. & Wang, R.-F. (2002). Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4⁺ T cells. *Cancer Res* **62**, 7195-7199.

WHO (2009). Pandemic (H1N1) 2009. URL:
<http://www.who.int/csr/disease/swineflu/en/index.html>, accessed March 10th 2010.

Zhirnov, O. P., Isaeva, E. I., Konakova, T. E., Thoidis, G., Piskareva, L. M., Akopova, I. I., Kartashov, A., Altstein, A. D., Ilyinskii, P. O. & other authors (2007). Protection against mouse and avian influenza A strains via vaccination with a combination of conserved proteins NP, M1 and NS1. *Influenza Other Respi Viruses* **1**, 71-79.

Zhou, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M. & Gao, G. F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* **5**, 321-328.

Figures

Figure 1. MHC-I and -II presentation of endogenously-expressed influenza M1 and NP

Scheme of (a) WT M1 or NP and (b) M1 or NP cloned with gp100 MHC-II mobilization sequences in pcDNA3.1 plasmid. (c, d) CD40-B cells (APCs) were electroporated with plasmids encoding wild type proteins (black bars), proteins cloned in fusion with the gp100 MHC-II mobilization sequences (grey bars) or an irrelevant mock (DKK1) protein (white bars), and presented to CD8⁺ (c) or CD4⁺ (d) T cell clones specific to each antigen. IFN- γ secretion was assessed by ELISA. The data are representative of 2 independent experiments. (e) Expression of the M1 and gp-M1 plasmids was evaluated by Western blot of transfected HEK-293T cells. The data are representative of 3 independent experiments. (f) Intracellular staining and flow cytometry analysis of NP and gp-NP expression from transfected HEK-293T. The data are representative of 2 independent experiments.

Figure 2. Characterization of human T lymphocytes expanded by *in vitro* sensitization with endogenously-expressed M1 and NP

NP- and M1-specific T lymphocytes were expanded from PBMCs with autologous APCs expressing WT proteins or optimized versions of MHC-II presentation as described in section Materials and Methods. The specificity of expanded T cell lines was assessed by co-culture with APCs expressing M1, gp-M1 (a), NP or gp-NP (b), and IFN- γ secretion was assessed by ELISA. Where indicated, MHC restriction was identified by the addition of MHC-I (black arrow) or -II (white arrow) blocking antibodies from ND #1, #2 and #3 T cell lines grown as described in section Materials and Methods. (c, d) The specificity of blocking antibodies was assessed with M1-specific CD8⁺ and NP-specific CD4⁺ T cell clones. Panel (c) is the MHC blocking antibody control for ND#1 and #2, panel (d) is the MHC blocking antibodies control for ND#3. Bars represent the mean \pm S.D. of duplicate cultures.

Figure 3. Effector cytokine secretion by CD8⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation

T cell lines were stained intracellularly for TNF, IFN- γ and IL-2 after 6 h of stimulation by CD40-B cells electroporated with relevant (cognate) or mock antigens. However, no IL-2 was detected in any of the CD8⁺ T cell lines and was excluded from the analysis. (a, b) The percentage of CD3⁺/CD8⁺ T lymphocytes producing both TNF and IFN- γ was analyzed in cell lines from 3 healthy donors cultured with CD40-B electroporated with M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD8⁺ T cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (Supplementary Figure 3b). Cytokine secretion from ND#1 (a) and #2 (b) was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.

Figure 4. Effector cytokine secretion by CD4⁺ T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation

T cell lines from 3 healthy donors were cultured, stimulated and stained as in Figure 3. Percentage of CD3⁺/CD4⁺ T cells producing TNF, IFN- γ or IL-2 were analyzed after co-culture with APCs expressing M1 and NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. The background of mock-stimulated CD4⁺ T cell lines was subtracted from the antigen-specific signal (Supplementary Figure 3b). Cytokine production from ND #1 (a) and #2 (b) T cell lines was assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 (c) was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences.

Figure 5. Surface effector phenotype of T lymphocytes specific to M1 or NP, with or without enhancement of MHC-II presentation

T cell lines from healthy donors were cultured, stimulated and stained as described in section Materials and Methods. (a) The percentage of CD45RA⁺/CD62L⁺ effector CD8⁺ T cells from 3 healthy donors was analyzed after co-culture with APCs expressing M1 or NP, with or without gp100 MHC-II mobilization sequences. Cytokine secretion and surface marker expression from ND #1 and #2 were assessed with the same target as used for expansion, while cytokine secretion for ND#3 was assessed with targets deprived of gp100 mobilization sequences for ND#3. (b) The same analysis performed in (a) was used for

CD45RA⁺/CD62L⁻ effector CD4⁺ T cells of M1- or NP-specific T cell lines from ND#1 and #2.

Figure 1

Doucet *et al.*

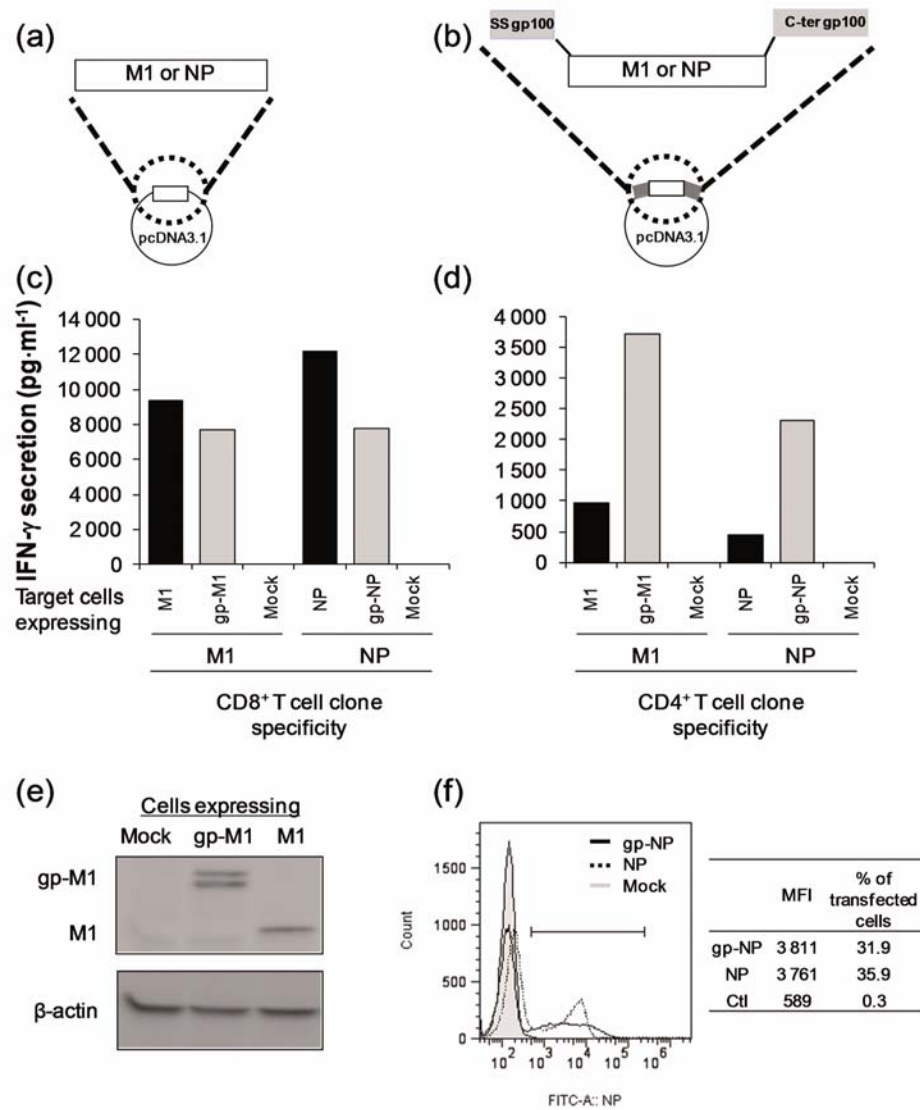


Figure 2

Doucet *et al.*

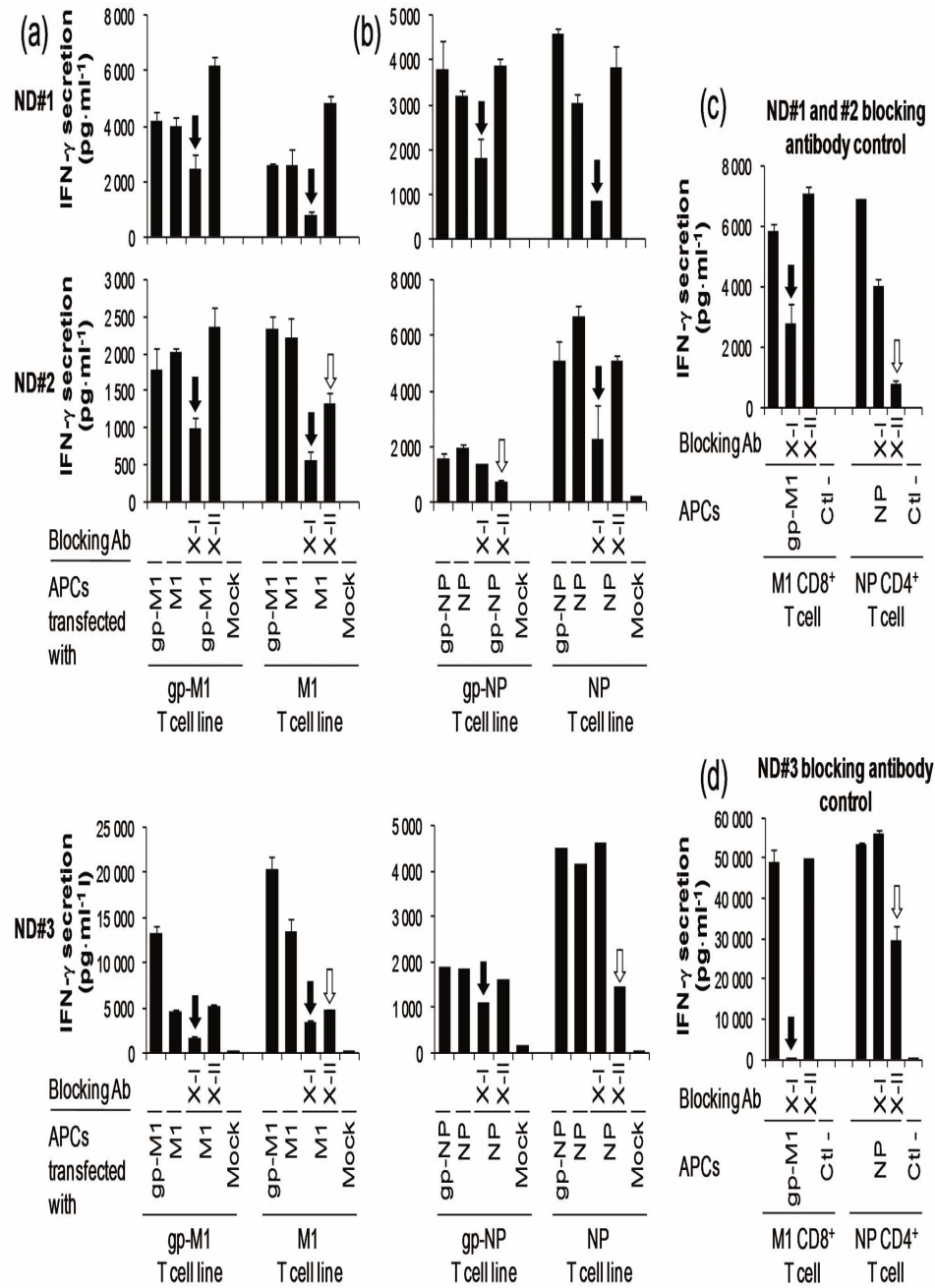


Figure 3

Doucet *et al.*

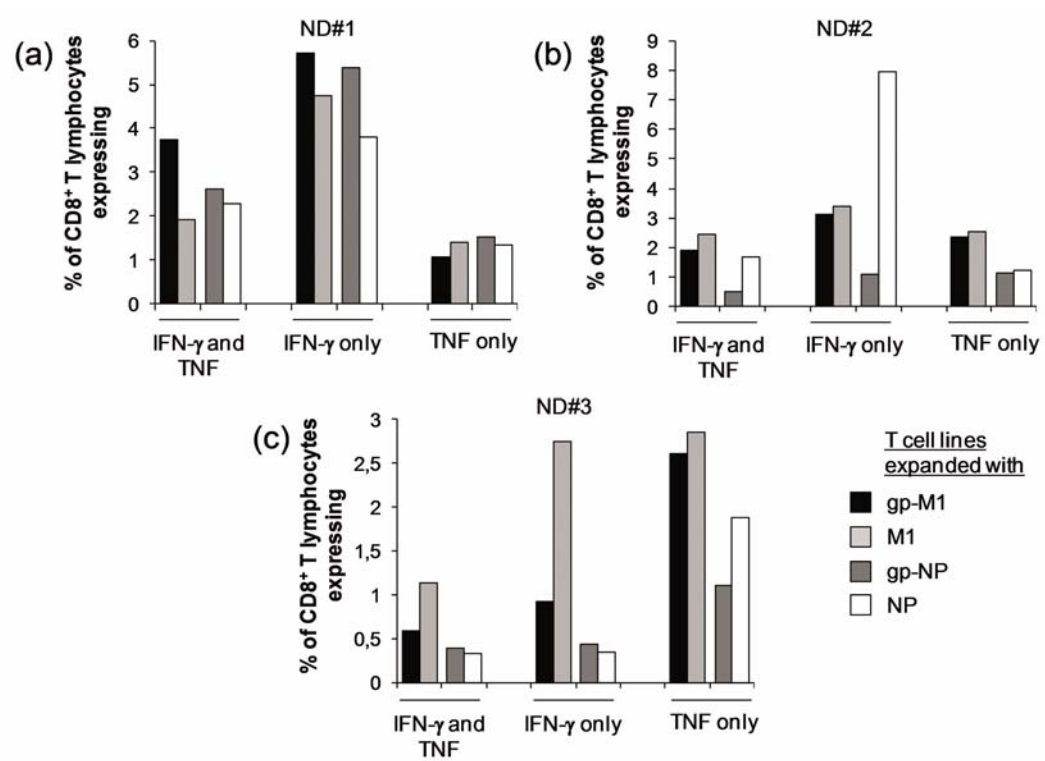


Figure 4

Doucet *et al.*

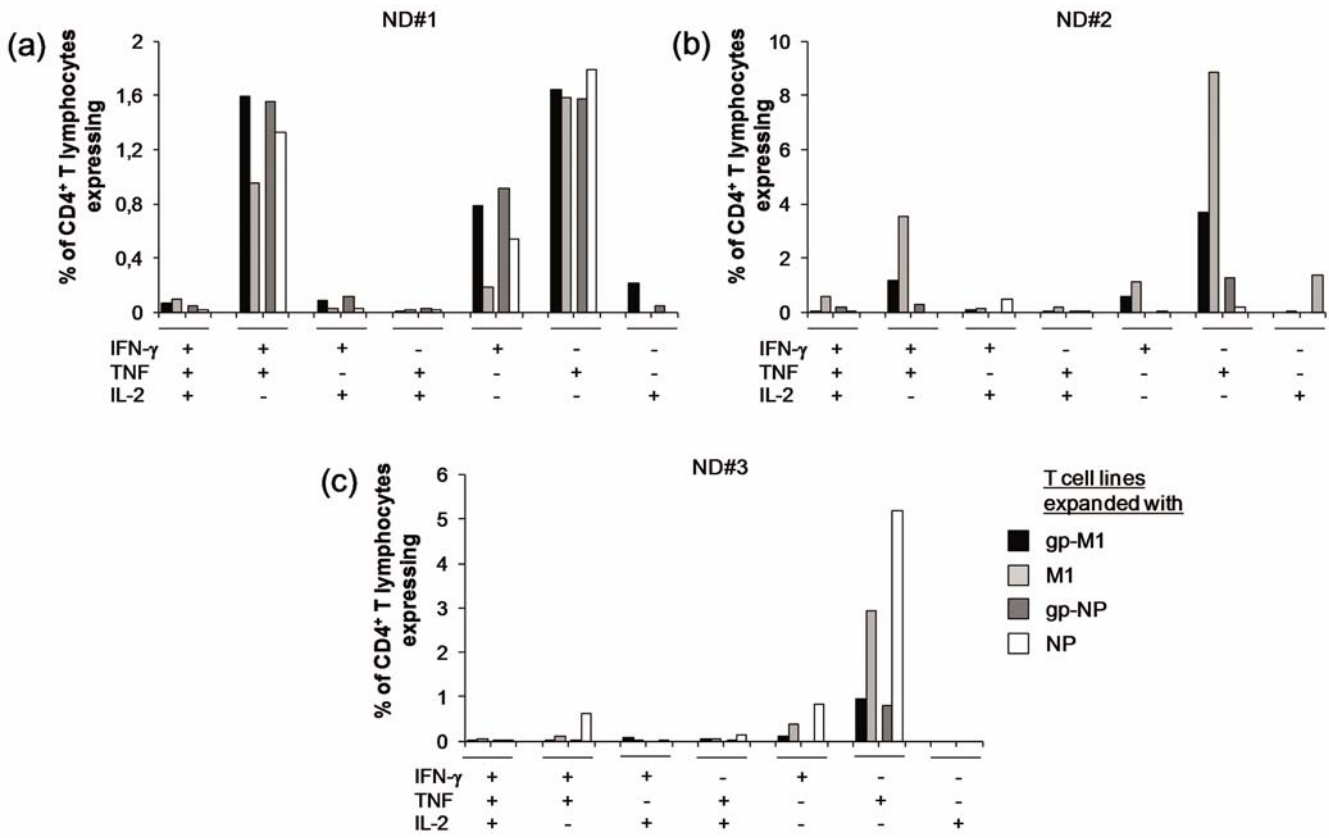


Figure 5

Doucet *et al.*

